



INSTITUTO DEL MAR DEL PERÚ

INFORME

Manual de métodos analíticos para la determinación del perfil bioquímico de organismos acuáticos



Octubre 2017

Callao, Perú

MANUAL DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DEL PERFIL BIOQUÍMICO DE ORGANISMOS ACUÁTICOS

MANUAL OF ANALYTICAL METHODS FOR BIOCHEMICAL PROFILE DETERMINATION OF AQUATIC ORGANISMS

Leenin Flores Ramos, Anthony Ruiz Soto*

RESUMEN

El presente manual describe los protocolos utilizados en el Laboratorio de Análisis Instrumental de la Dirección General de Investigaciones en Acuicultura, del Instituto del Mar del Perú. Se basa en metodologías adaptadas e implementadas en diferentes proyectos de investigación, se describen diez protocolos para la determinación de: (1) proteínas totales en microalgas liofilizadas, (2) proteínas totales en tejido de organismos acuáticos, (3) carbohidratos totales en microalgas liofilizadas, (4) carbohidratos totales en tejido de organismos acuáticos, (5) lípidos totales en microalgas liofilizadas, (6) lípidos totales en tejido de organismos acuáticos, (7) ácidos grasos en extractos lipídicos de organismos acuáticos, (8) ácidos grasos en cultivo de microalgas, (9) humedad en biomasa de organismos acuáticos y (10) cenizas en biomasa de microalgas liofilizadas.

Palabras clave: Acuicultura, microalgas, biomasa, organismos acuáticos.

ABSTRACT

In this manual, the protocols used in the Laboratory of Instrumental Analysis of the Dirección General de Investigaciones en Acuicultura, del Instituto del Mar del Perú are described. Protocols are based on methodologies adapted and implemented in different research projects. Ten protocols are described for the determination of: (1) total proteins in lyophilized microalgae, (2) total proteins in tissue of aquatic organisms, (3) total carbohydrates in lyophilized microalgae, (4) total carbohydrates in tissue of aquatic organisms, (5) total lipids in lyophilized microalgae, (6) total lipids in aquatic organ tissue, (7) fatty acids in lipid extracts of aquatic organisms, Culture of microalgae, (9) moisture in biomass of aquatic organisms and (10) ashes in lyophilized microalgae biomass.

Keywords: Aquaculture, microalgae, biomass, aquatic organisms.

INTRODUCCIÓN

El uso de microalgas en diferentes sistemas de producción ha sido motivado por la capacidad de estos microorganismos para convertir sustancias inorgánicas en biomoléculas orgánicas de importancia industrial (tales como lípidos, proteínas, carbohidratos y pigmentos), aunque en composiciones y concentraciones variables, influenciadas por la naturaleza del organismo, las condiciones ambientales y el estado fisiológico del cultivo (DÍAZ PALMA et al. 2012). Los productos celulares del cultivo de microalgas ofrecen una variedad de aplicaciones tales como la producción de alimentos, la producción de energía química y la extracción de pigmentos. Además, estos microorganismos poseen altas tasas de crecimiento, ofreciendo así ventajas tecnológicas y comerciales en comparación con técnicas convencionales para producir estos nutrientes (THAJUDDIN & SUBRAMANIAN 2005).

Este manual presenta los protocolos utilizados en el Laboratorio de Análisis Instrumental de la Dirección General de Investigaciones en Acuicultura del Instituto del Mar del Perú, y que corresponden a metodologías adaptadas e implementadas para el desarrollo de los siguientes proyectos de investigación:

- Proyecto N°025-FINCyT-PIBAP-2007, "Determinación de la biomasa microalgal potencialmente acumuladora de lípidos para la obtención de combustible". (2007-2010)
- Proyecto FIDECOM N°018-PIPEI 2012, "Desarrollo de un protocolo biotecnológico para la obtención de aceite de microalgas rico en DHA utilizando biorreactores tubulares". (2012-2014)
- Proyecto N°236-FINCyT-IA-2013: "Producción de semilla del lenguado *Paralichthys adspersus*: II Mejoramiento de las técnicas de larvicultura". (2013-2015)

* Iflores@imarpe.gob.pe. Laboratorio de Análisis Instrumental del Área funcional de Investigaciones en Acuicultura, Dirección General de Investigaciones en Acuicultura, del Instituto del Mar del Perú.

- Proyecto PIBA-2-P-031-14, “Secuenciamiento y anotación del transcriptoma de microalgas oleaginosas de la amazonia peruana promisorias para la producción sustentable de biodiesel: descubrimiento de genes y descripción de vías metabólicas”. (2015-2016)

El manual presenta un esquema específico. Cada protocolo inicia con su objetivo general, el alcance y aplicación, luego se listan los equipos, materiales y reactivos que son indispensables para su ejecución, además una descripción detallada del procedimiento, las ecuaciones y cálculos que son necesarios para cuantificar el parámetro analizado. Finalmente se citan algunas referencias bibliográficas utilizadas en cada método.

MARCO TEÓRICO

Es reconocido que la composición química de los alimentos de origen animal y vegetal es el punto básico para el entender el funcionamiento de los procesos fisiológicos que permiten al organismo producir compuestos complejos que pueden ser usados como fuente de energía y de otros nutrientes. El análisis proximal o análisis de Weende es un método general y estandarizado de evaluación de los materiales que se usarán para formular una dieta como fuente de proteína o de energía, así mismo como un control para verificar que alimentos finales cumplan con las especificaciones o requerimientos establecidos durante por la formulación (OLVERA NOVOA et al. 1993)

Los cultivos de microalgas han permitido obtener un mayor conocimiento sobre la complejidad de los ciclos de vida de diversas especies, generándose información sobre los diferentes estudios, toxicidad, requerimientos nutricionales, fisiología, información genética, biodiversidad, sistemática, entre otros. Además, los cultivos de microalgas son un apoyo importante para estudios ecológicos y de monitoreo, funcionando como referencias taxonómicas, para la detección de especies productoras de metabolitos tóxicos, estudios de pastoreo. Experi-

mentos *in vitro* permiten describir procesos que en ocasiones son difíciles de realizar en el campo como es la interacción de diferentes estadios del ciclo de vida con variables ambientales que favorecen o inhiben la presencia de especies y cepas en diferentes regiones, así como las adaptaciones específicas que presentan cepas de una misma especie a ambientes particulares (ARREDONDO & VOLTOLINA 2007).

El componente cuantitativamente más importante de la biomasa orgánica de la mayoría de las microalgas son las proteínas, las cuales pueden representar hasta más del 50% del peso seco total y que, sumadas a los lípidos y a los carbohidratos constituyen hasta el 90% del peso seco total, mientras que los minerales, los ácidos nucleicos, los pigmentos y los demás componentes menores suman el restante 10% (ARREDONDO & VOLTOLINA 2007).

El método para la determinación de proteínas consiste en la determinación espectrofotométrica de la intensidad de color obtenido con el reactivo de Folin-Ciocalteu (ácido fosfomolibdico-túngstico: FTM), después de un tratamiento con solución alcalina de cobre. El FTM oxida los aminoácidos aromáticos como tirosina y triptófano presentes en la mayoría de las proteínas, reduciéndose a heteropolimolibdeno azul. Esta reacción es catalizada por el cobre y da como resultado un color azul, cuya intensidad depende del contenido de tirosina y/o triptófano en la muestra (HARTREE 1972).

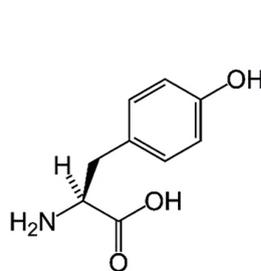


Figura1: Tirosina

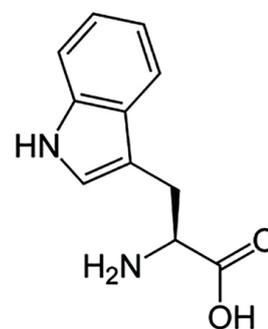


Figura 2: Triptófano

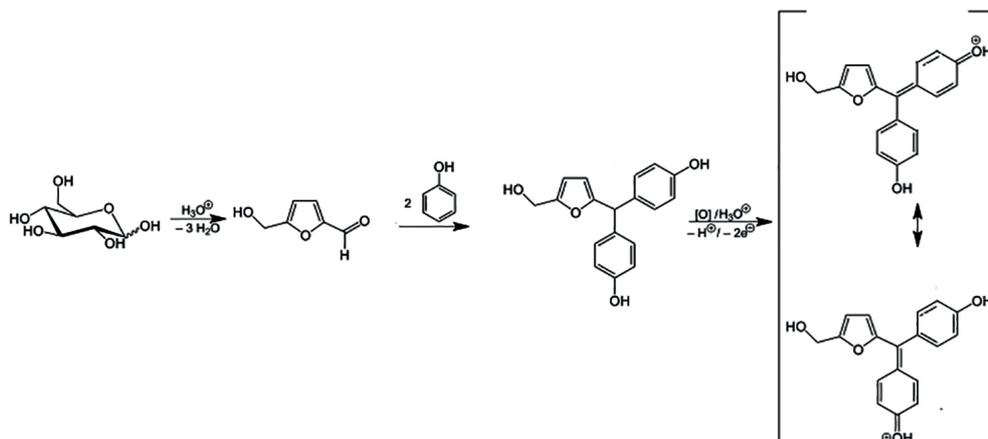


Figura 3: Reacción entre el carbohidrato y el fenol en medio ácido

El contenido de carbohidratos de las microalgas puede variar ampliamente, dependiendo de las condiciones de cultivo, entre aproximadamente el 10 y el 50% de la biomasa orgánica seca cuando el crecimiento no está limitado. Estos porcentajes tienden a aumentar en condiciones de limitación de nutrientes o como resultado de un cambio en la tasa de crecimiento. Para la determinación de carbohidratos de las microalgas se obtienen mediante una extracción con ácido sulfúrico diluido. El fenol es un alcohol altamente reactivo que reacciona con los azúcares reductores, este proceso requiere una gran cantidad de energía proporcionada por la reacción entre el ácido sulfúrico y el agua. El producto resultante es un compuesto amarillo-marrón, con pico de absorción a 485 nm (DUBOIS et al. 1956).

Una de las mayores fuentes de energía en las cadenas tróficas acuáticas se encuentra almacenada en forma de lípidos dentro de las microalgas. Los lípidos incluyen principalmente a los ácidos grasos, que normalmente se encuentran unidos por un enlace éster a la glicerina o a otros alcoholes como el colesterol, o por enlaces amida a bases de cadena larga y ocasionalmente a otras aminas (CHRISTIE 2003). Para la determinación de lípidos el método consiste en la extracción de lípidos a partir de biomasa microalgal, mediante una mezcla de solventes y el posterior aislamiento de la fase orgánica a través de evaporación de éstos y concentración del extracto.

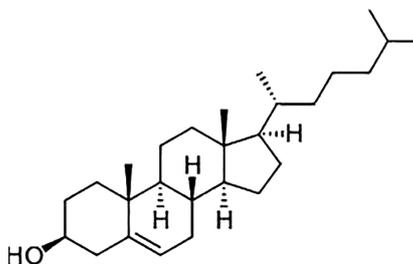


Figura 4: Colesterol (lípidos)

Los ácidos grasos son ácidos monocarboxílicos con cadenas hidrocarbonadas desde 4 a 28 carbonos, saturadas o insaturadas; los más comunes tienen un número par de carbonos, entre 12 y 24, y no son ramificados. Sin embargo, hay ejemplos de ácidos grasos ramificados, hidroxilados o con anillos de tres carbonos (IUPAC 2016).

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

- Ácidos grasos saturados. Son ácidos grasos sin dobles enlaces entre carbonos; tienden a ser sólidos a temperatura ambiente.
- Ácidos grasos insaturados. Son ácidos gra-

cos con dobles enlaces entre carbonos; suelen ser líquidos a temperatura ambiente.

c. Ácidos grasos monoinsaturados (MUFAs de sus siglas en inglés). Son ácidos grasos insaturados con un solo doble enlace entre carbonos.

d. Ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs de sus siglas en inglés) Son ácidos grasos insaturados con más de un doble enlace entre carbonos.

Para representar a los ácidos grasos de cadena lineal se ha optado por usar la notación de los bioquímicos y fisiologistas en el cual el ácido graso es representado mediante las siguientes fórmulas (TVRZICKÁ et al. 2012).

CN:0, si es un ácido graso saturado

CN:pn-x, si es un ácido graso insaturado

Dónde:

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

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

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

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

Como ejemplo de esta representación se muestran al ácido palmítico:



Figura 5: Ácido palmítico (16:0)

Para la determinación de ácidos grasos totales el método consiste en la derivatización de los ácidos grasos a sus correspondientes metilésteres, y su análisis posterior por cromatografía gaseosa. La cromatografía de gases es una técnica cromatográfica en la que la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. La elución se produce por el flujo de una fase móvil de gas inerte.

El proceso de derivatización más común consiste en transformar los ácidos grasos a metil ésteres de ácidos grasos mediante una reacción de transesterificación usando metanol y condiciones ácidas o básicas como se muestra en la Figura 6 (TOROSI BAUDINO 2006).

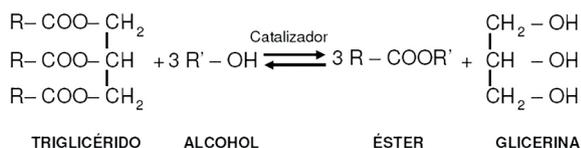


Figura 6: Reacción de transesterificación

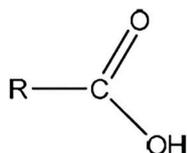


Figura 7. Representación estructural de la molécula de ácido graso. R: cadena alifática.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer a Carla Aguilar Samanamud por su apoyo y revisión crítica al manuscrito, y a todos los investigadores del Área de Investigaciones en Acuicultura por las recomendaciones en la elaboración del presente manual.

REFERENCIAS

- AOAC. 1980. Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemist. Washington: AOAC.
- ARREDONDO BO, VOLTOLINA D. 2007. Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal. México: Centro de Investigaciones Biológicas del Noereste.
- CHRISTIE WW. 2003. Lipid Analysis: Isolation, Separation, Identification and Structural Analysis of Lipids. Bridgwater, Inglaterra: The oily press.
- DÍAZ PALMA P, STEGEN S, QUEIROLO F, ARIAS D, ARAYA S. 2012. Biochemical profile of halophilous microalgae strains from high-andean extreme ecosystems (NE-Chile) using methodological validation approaches. Journal of Bioscience and Bioengineering, 113 (6), 730-736.
- DUBOIS M, GILLES KA, HAMILTON JK, REBERS PA, SMITH F. 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. Anal. Chem., 28 (3), pp 350-356.
- FOLCH J, LEES M, SLOANE STANLEY GH. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. The Journal of Biological Chemistry, 226(1):497-509.
- GRIFFITHS MJ, HILLE RP VAN, HARRISON STL. 2010. Selection of Direct Transesterification as the Preferred Method for Assay of Fatty Acid Content of Microalgae. Lipids 45:1053-1060.
- HARTREE EF. 1972. Determination of protein: a modification of Lowry method that gives a linear photometric response. Analytical Biochemistry, 48: 422-427.
- ICHIHARA, K., & FUKUBAYASHI, Y. (2010). Preparation of fatty acid methyl esters for gas-liquid chromatography. J Lipid Res, 51(3): 635-640.
- IUPAC. (24 de Febrero de 2016). iupac goldbook. Obtenido de <http://goldbook.iupac.org/F02330.html>
- OLVERA NOVOA MA, MARTÍNEZ PALACIOS CE, REAL DE LEÓN E. 1993. Manual de técnicas para laboratorio de nutrición de peces y crustáceos. Roma: FAO (Documento de campo N° 7).
- PRIETO GUEVARA MJ. 2006. Alimento vivo y su importancia en la acuicultura. Revista Electronica de Ingenieria en Produccion Acuicola, 2 (2).
- Thajuddin N, Subramanian G. 2005. Cyanobacterial biodiversity and potential applications in biotechnology. Current science 89(1), 47-57.
- TOROSI BAUDINO FD. 2006. Reacciones en contexto: la transesterificación en la producción de biodiésel a partir de aceite de fritura usado. Real Sociedad Española de Química, 102(3), 43-49.
- TVRZICKÁ E, ZÁK A, VECKA M, STANKOVÁ B. 2009. Fatty acids in human metabolism. In: Hänninen OOP, Atalay M, (Ed) Physiology and Maintenance, Vol. II. Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS Publications)
- UNIVERSIDAD NACIONAL ABIERTA Y A DISTANCIA. (s.f.). unad. Recuperado el 22 de Febrero de 2016, de http://datateca.unad.edu.co/contenidos/301106/EXE_301106/21_estructura_del_tejido_muscular_del_pescado.html

PROCOLOS



PROTOCOLO DE DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES EN MICROALGAS LIOFILIZADAS

CÓDIGO: DGIA / LB/02.01/PR

Rev. N°.	Fecha	Descripción de la Modificación	Edición	Aprobado por
0	2/09/2015		01	

DISTRIBUIDO A:

DEC		DGIA		AFIA	
-----	--	------	--	------	--

Copia No:

ESTA ES UNA COPIA CONTROLADA, SALVO SE INDIQUE DE OTRA MANERA.

Elaborado: Qco. Leenin Flores Ramos Fecha: Julio 2015	Revisado: M.Sc. María Elena Jacinto Tayco Fecha: Setiembre 2015	Autorizado: Ing. Lili Carrera Santos Director DGIA Fecha: Setiembre 2015
---	---	---

	PROTOCOLO -IMARPE-	DGIA / LB/02.01/PR
	DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES EN TEJIDO DE ORGANISMOS ACUÁTICOS	Edición: 01 Revisión: 0 Fecha : 07/09/2015 Página 2 de 6

1. OBJETIVO:

Determinar el porcentaje de proteína en muestra de microalga liofilizada por espectrofotometría UV-Vis usando el método Hartree-Lowry, 1972.

2. ALCANCE:

Esta técnica se aplica a muestras de microalgas marinas y continentales liofilizadas.

3. TÉRMINOS Y DEFINICIONES

Microalgas: Microorganismos fotosintéticos del orden de las micras en unidad de medidas, pueden ser unicelulares, filamentosas ó coloniales, presentan como estructura externa membrana y/o pared celular ó exoesqueleto de sílice, son, además, capaces de transformar el CO₂ en biomasa orgánica.

Liofilización: es un proceso de deshidratación de productos bajo baja presión (vacío) y moderada temperatura. En la liofilización no ocurre la evaporación del agua a partir del estado líquido - normal en procesos de secados - sino la sublimación del hielo.

4. RESPONSABILIDADES

El Responsable o Jefe de Laboratorio:

- 4.1 Es responsable de asegurar el cumplimiento del presente protocolo.
- 4.2 Supervisa que los controles de calidad se realice.
- 4.3 Supervisa el correcto ingreso de datos de los registros internos de trabajo.
- 4.4 Designa y autoriza al personal capacitado para manejar el equipo.

El Analista:

- 4.5 Aplica el presente protocolo.
- 4.6 Realiza el mantenimiento externo del equipo y sus componentes.
- 4.7 Ingresa los datos en la hoja de cálculo.
- 4.8 Elabora el informe de ensayo.
- 4.8 Llena los registros internos de trabajo.

5. EQUIPOS Y MATERIALES

5.1 EQUIPOS

- Espectrofotómetro UV-Visible Varian Cary 50
- Centrífuga refrigerada Eppendorf Centrifuge 5702R
- Balanza analítica de 220 g de 5 decimales Sartorius MSU225S-000-DU
- Vortex VELP Scientifica Wizard
- Baño de ultrasonido Branson 2510
- Termobañó (baño maría) MRC BH-200

5.2 MATERIALES

- Micropipeta de rango variable 10-100 µL.
- Micropipeta de rango variable 100-1000 µL.
- Tubos de ensayo de 10 mL con tapa de teflón.

Elaborado: Qco. Leenin Flores Ramos Fecha: Julio 2015	Revisado: M.Sc. María Elena Jacinto Tayco Fecha: Setiembre 2015	Autorizado: Ing. Lili Carrera Santos Director DGIA Fecha: Setiembre 2015
---	---	---



PROTOCOLO
-IMARPE-

DGIA / LB/02.01/PR

**DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES EN TEJIDO
DE ORGANISMOS ACUÁTICOS**

Edición: 01
Revisión: 0
Fecha : 07/09/2015
Página 3 de 6

- Pipetas graduadas de 5 mL.
- Pipeta volumétrica de 3 mL.

5.3 REACTIVOS

- Patrón de albúmina de suero bovino (BSA) 600 µg/mL: Se disuelve 30 mg de BSA en una fiola de 50 mL con agua ultrapura.
- Hidróxido de sodio 1 N: Se prepara la cantidad conveniente para el análisis a partir de NaOH P.A y agua ultrapura.
- Hidróxido de sodio 0.5 N: Se mezcla un volumen de NaOH 1 N preparado previamente con un volumen igual de agua ultrapura.
- Reactivo A: Se mezcla 2 g de Tartrato de sodio y potasio tetrahidratado, 100g de carbonato de sodio anhidro, 500 mL NaOH 1 N y agua ultrapura hasta completar un litro. Este reactivo puede ser almacenado entre dos a tres meses.
- Reactivo B: Se mezcla 2 g de Tartrato de sodio y potasio tetrahidratado, 1 g de sulfato de cobre pentahidratado, 90 mL de agua ultrapura y 10 mL de NaOH 1 N. Este reactivo puede ser almacenado entre dos a tres meses.
- Reactivo C: Se mezcla dos volúmenes del reactivo de Folin-Ciocalteu 2 N con 15 volúmenes de agua ultrapura, este reactivo se prepara inmediatamente antes de su uso.

6. PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

6.1 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

- Etiquete todos los tubos con marcador indeleble y coloque cinta adhesiva transparente alrededor de la marca para evitar que se borre durante el tratamiento del termo-baño.
- Pese 5 mg de biomasa liofilizada en un tubo de ensayo de 10 mL con tapa, repita esta operación 2 veces (duplicado) por cada muestra a analizar. Prepare 1 tubo sin muestra (blanco de reactivos).
- Agregue 5 mL de una solución de NaOH a cada tubo, incluyendo el blanco de reactivos según los valores de la Tabla 1.

Tabla 1. Condiciones de hidrólisis para muestras de microalgas según Arredondo y Voltolina, 2007

MICROALGA	[NaOH] (N)	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (min)
<i>Amphora</i> sp.	0.2	100	20
<i>Arthrospira platensis</i>	0.5	75	60
<i>Chaetoceros</i> sp.	0.1	100	10
<i>Dunaliella</i> sp.	0.1	100	60
<i>Exuviella</i> sp.	0.1	100	30
<i>Haematococcus</i> sp.	1.0	100	60
<i>Isochrysis</i> sp.	0.1	80	10
<i>Nitzshia</i> sp.	0.2	100	20
<i>Pavlova lutheri</i>	0.1	80	10
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	0.1	100	20
<i>Skeletonema costatum</i>	0.2	90	20
<i>Tetraselmis</i> sp.	0.1	100	10

Elaborado: Qco. Leenin Flores Ramos
Fecha: Julio 2015

Revisado: M.Sc. María Elena Jacinto Tayco
Fecha: Setiembre 2015

Autorizado: Ing. Lili Carrera Santos
Director DGIA
Fecha: Setiembre 2015



PROTOCOLO
-IMARPE-

DGIA / LB/02.01/PR

**DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES EN TEJIDO
DE ORGANISMOS ACUÁTICOS**

Edición: 01
Revisión: 0
Fecha : 07/09/2015
Página 4 de 6

- Homogenice los tubos de ensayo en un baño de ultrasonido por 15 min.
- Hidrolice las muestras en un termo-baño a la temperatura y el tiempo determinado según los valores de la Tabla 1. Transcurrido este tiempo, los tubos se retiran y se dejan enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente.
- Homogenice nuevamente los tubos de ensayo en un baño de ultrasonido para mejorar la extracción, luego centrifúguelos a 3000 rpm y 4 °C durante 15 min.
- Transfiera el extracto alcalino, con la ayuda de una pipeta Pasteur, a otro tubo limpio y etiquetado con la misma información registrada en el tubo donde se realizó la extracción. Si el paquete celular muestra una coloración amarillenta, se recomienda hacer una segunda extracción, con la concentración de NaOH correspondiente y siguiendo la misma metodología que en la primera extracción (temperatura, tiempo y centrifugación). Para la segunda extracción, se puede usar la misma cantidad, o un volumen menor de NaOH que en la primera extracción. Nota: el total de mililitros de NaOH dependerá de la concentración celular (cel/mL) de la muestra. Para cultivos muy concentrados, se puede utilizar hasta un total de 10 mL de NaOH.
- Coloque el extracto alcalino obtenido en la segunda extracción en el mismo tubo donde está la primera extracción y mezcle con el vortex durante 1 minuto.
- Del extracto alcalino total obtenido, se recomienda tomar 3 volúmenes diferentes, midiendo con una micropipeta 250, 500 y 750 μ L y se les completa a 1 mL con NaOH (Cada volumen en un tubo de cristal, debidamente etiquetado). Estas muestras se agitan con el vortex para su total homogenización, y sirven para asegurar que al menos una de las concentraciones obtendrá una absorbancia en el rango de trabajo de la curva de calibración. Si no fuere así tomar un volumen que permita que la señal se encuentre dentro de la curva de calibración.

6.2 CURVA DE CALIBRACIÓN

- La curva de calibración se prepara a partir de una solución patrón de 600 μ g/mL de suero albúmina de bovina (BSA), del cual se prepara 10 mL de una solución 1:1 de BSA 600 μ g/mL con NaOH 1N obteniendo el patrón de BSA 300 μ g/mL en NaOH 0.5N, a partir de la cual se hace un gradiente de concentración desde 0 a 150 μ g/mL de BSA en tubos de ensayo (Tabla 2).

Tabla 2. Cantidades para la curva de calibración

TUBO	VOLUMEN BSA (300 μ g/mL) (μ L)	VOLUMEN NaOH 0.5N (μ L)	CONCENTRACIÓN DE BSA (μ g/mL)
Blanco	0	1000	0
1	100	900	30
2	200	800	60
3	300	700	90
4	400	600	120
5	500	500	150

Elaborado: Qco. Leenin Flores Ramos
Fecha: Julio 2015

Revisado: M.Sc. María Elena Jacinto Tayco
Fecha: Setiembre 2015

Autorizado: Ing. Lili Carrera Santos
Director DGIA
Fecha: Setiembre 2015



PROCOLO
-IMARPE-

DGIA / LB/02.01/PR

**DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES EN TEJIDO
DE ORGANISMOS ACUÁTICOS**

Edición: 01
Revisión: 0
Fecha : 07/09/2015
Página 5 de 6

- Una vez preparado los estándares, se continúa con los procesos que se describen a partir del ítem 6.3.a en paralelo con las muestras y el blanco de reactivos.

6.3 ENSAYO DE PROTEÍNAS, método adaptado de Hartree-Lowry 1972

- Añada 0.9 mL del Reactivo A, a cada estándar, muestra, blanco de reactivos y mezcle con el vórtex.
- Incube los tubos en Termo-baño a 50 °C durante 10 min y deje enfriar a temperatura ambiente.
- Adicione 0.1 mL del Reactivo B a cada tubo, mezcle con el vórtex y deje reposar durante 10 min a temperatura ambiente.
- Añada rápidamente 3 mL del Reactivo C a cada tubo, mezcle con el vórtex y deje reposar a temperatura ambiente durante 20 min.
- Las absorbancias se leen en un espectrofotómetro UV-Vis a una longitud de onda de 650 nm.

6.4 CONTROL DE CALIDAD.

El duplicado de la muestra deberá tener una desviación estándar relativa porcentual (RSD%) menor a 4%, en caso contrario se repite la prueba.

7. PROCESAMIENTO DE DATOS Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Para obtener el porcentaje de proteínas en la muestra se calcula mediante la fórmula:

$$\% \text{ Proteinas} = \frac{C * V_E}{P_s * V_a * 1000000} * 100$$

Dónde:

C_m = Concentración de proteínas de la curva de calibración ($\mu\text{g/mL}$)

V_E = Volumen de extracción (mL)

P_s = Peso de la microalga liofilizada (g)

V_a = Volumen de alícuota (mL)

	PROTOCOLO -IMARPE-	DGIA / LB/02.01/PR
	DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES EN TEJIDO DE ORGANISMOS ACUÁTICOS	Edición: 01 Revisión: 0 Fecha : 07/09/2015 Página 6 de 6

8. FORMATO DE REGISTRO DE DATOS LB / F – PR 02.01

Proteínas					
	W muestra (g)				
A					
B					
		$V_{\text{extraccion}}$ (mL)			
		V_{alicuota} (mL)			
Curva de calibración					
C (µg/mL)	Abs				
0					
30					
60					
90					
120					
150					
		Pendiente (m)			
		Intercepto (b)			
		Coeficiente (R ²)			
Blanco					
Réplica	Abs	C (µg/mL)	W proteína extracto (µg)	W muestra (µg)	%Proteínas (w/w)
A					
B					
				Promedio	
				RSD%	

9. BIBLIOGRAFIA

Arredondo, B. O., & Voltolina, D. (2007). *Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal*. México: Centro de Investigaciones Biológicas del Noereste.

Hartree, E. F. (1972). Determination of protein: a modification of Lowry method that gives a linear photometric response. *Analytical Biochemistry*, 48: 422-427.

Elaborado: Qco. Leenin Flores Ramos Fecha: Julio 2015	Revisado: M.Sc. María Elena Jacinto Tayco Fecha: Setiembre 2015	Autorizado: Ing. Lili Carrera Santos Director DGIA Fecha: Setiembre 2015
---	---	---



PROTOCOLO DE DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES EN TEJIDO DE ORGANISMOS ACUÁTICOS

CÓDIGO: DGIA / LB/02.01/PR

Rev. N°.	Fecha	Descripción de la Modificación	Edición	Aprobado por
0	2/09/2015		01	

DISTRIBUIDO A:

DEC		DGIA		AFIA	
-----	--	------	--	------	--

Copia No:

ESTA ES UNA COPIA CONTROLADA, SALVO SE INDIQUE DE OTRA MANERA.

Elaborado: Qco. Leenin Flores Ramos Fecha: Julio 2015	Revisado: M.Sc. María Elena Jacinto Tayco Fecha: Setiembre 2015	Autorizado: Ing. Lili Carrera Santos Director DGIA Fecha: Setiembre 2015
---	---	---



PROCOLO
-IMARPE-

DGIA / LB/02.01/PR

**PROCOLO DE DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS
TOTALES EN TEJIDO DE ORGANISMOS ACUÁTICOS**

Edición: 01
Revisión: 0
Fecha : 07/09/2015
Página 2 de 6

1. OBJETIVO:

Determinar el porcentaje de proteína en muestra de tejido de organismos acuáticos por espectrofotometría UV-Vis usando el método Hartree-Lowry, 1972.

2. ALCANCE:

Esta técnica se aplica a muestras de tejidos de peces, ovocitos y larvas de peces, gónadas de erizo y alimento vivo.

3. TÉRMINOS Y DEFINICIONES

Tejido de pez: La musculatura del pescado está constituida por un sistema que va a lo largo en forma paralela, de todo el cuerpo, el cual se halla dividido en dirección dorsoventral por las apófisis vertebrales y radios de las aletas y en sentido horizontal por las paredes divisiones o septas (tabiques de tejido conectivo o miocomata).

Alimento vivo: Describe el grupo de organismos planctónicos que constituyen la base en la alimentación de los estadios larvarios de los crustáceos, las postlarvas de peces y las diferentes fases en el desarrollo de los moluscos. Entre el zooplancton se destacan organismos tales como las artemias y los rotíferos.

4. RESPONSABILIDADES

El Responsable o Jefe de Laboratorio:

- 4.1 Es responsable de asegurar el cumplimiento del presente protocolo.
- 4.2 Supervisa que los controles de calidad se realicen.
- 4.3 Supervisa el correcto ingreso de datos de los registros internos de trabajo.
- 4.4 Designa y autoriza al personal capacitado para manejar el equipo.

El Analista:

- 4.5 Aplica el presente protocolo.
- 4.6 Realiza el mantenimiento externo del equipo y sus componentes.
- 4.7 Ingresa los datos en la hoja de cálculo.
- 4.8 Elabora el informe de ensayo.
- 4.8 Llena los registros internos de trabajo.

5. EQUIPOS Y MATERIALES

5.1 EQUIPOS

- Espectrofotómetro UV-Visible Varian Cary 50
- Centrífuga refrigerada Eppendorf Centrifuge 5702R
- Balanza analítica de 220g de 5 decimales Sartorius MSU225S-000-DU
- Vórtex Velp Scientifica Wizard
- Ultrasonido QSonica Q125.
- Termobañero MRC BH-200
- Baño de ultrasonido Branson 2510

5.2 MATERIALES

- Micropipeta de rango variable 10-100 µL.
- Micropipeta de rango variable 100-1000 µL.

Elaborado: Qco. Leenin Flores Ramos
Fecha: Julio 2015

Revisado: M.Sc. María Elena Jacinto Tayco
Fecha: Setiembre 2015

Autorizado: Ing. Lili Carrera Santos
Director DGIA
Fecha: Setiembre 2015



PROTOCOLO
-IMARPE-

DGIA / LB/02.01/PR

**PROTOCOLO DE DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS
TOTALES EN TEJIDO DE ORGANISMOS ACUÁTICOS**

Edición: 01
Revisión: 0
Fecha : 07/09/2015
Página 3 de 6

- Tubos de ensayo de 10 mL con tapa de teflón.
- Pipeta volumétrica de 3 mL.
- Pipeta volumétrica de 10 mL.

5.3 REACTIVOS

- Patrón de albúmina de suero bovino (BSA) 600 µg/mL: Se disuelve 30 mg de BSA en una fiola de 50 mL con agua ultrapura.
- Hidróxido de sodio 1 N: Se prepara la cantidad conveniente para el análisis a partir de NaOH P.A y agua ultrapura.
- Hidróxido de sodio 0.5 N: Se mezcla un volumen de NaOH 1 N preparado previamente con un volumen igual de agua ultrapura.
- Reactivo A: Se mezcla 2 g de Tartrato de sodio y potasio tetrahidratado, 100 g de carbonato de sodio anhidro, 500 mL NaOH 1 N y agua ultrapura hasta completar un litro. Este reactivo puede ser almacenado entre dos a tres meses.
- Reactivo B: Se mezcla 2 g de Tartrato de sodio y potasio tetrahidratado, 1 g de sulfato de cobre pentahidratado 90 mL de agua ultrapura y 10 mL de NaOH 1 N. Este reactivo puede ser almacenado entre dos a tres meses.
- Reactivo C: Se mezcla dos volúmenes del reactivo de Folin-Ciocalteau 2 N con 15 volúmenes de agua ultrapura, este reactivo se prepara inmediatamente antes de su uso.

6. PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

6.1 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

- Etiquete todos los tubos con marcador indeleble y coloque cinta adhesiva transparente alrededor de la marca para evitar que se borre durante el tratamiento del termo-baño
- Pese 50 mg de tejido en un tubo de ensayo de 10 mL con tapa, repita esta operación 2 veces (duplicado) por cada muestra a analizar. Prepare 1 tubo sin muestra (blanco de reactivo).
- Agregue 10 mL de agua ultrapura a cada tubo, incluyendo el blanco de reactivo.
- Homogenice los tubos de ensayo en baño de hielo mediante ultrasonido a una potencia de 125 W durante 1 min.
- Transfiera una alícuota de la solución y agua ultrapura a otro tubo limpio de acuerdo al tipo de tejido (ver Tabla 1), etiquete con la misma información registrada en el tubo donde se realizó la homogenización.
- Agregue 0.5 mL de NaOH 1 N a cada tubo, incluyendo el blanco de reactivo.

Tabla 1: Volúmenes para muestras de tejidos de organismos acuáticos

TEJIDO DE ORGANISMO ACUÁTICO	VOLUMEN DE SOLUCIÓN (µL)	VOLUMEN DE H ₂ O (µL)
Tejidos de peces	100	400
Ovocitos y larvas de peces	500	0
Gónadas de Erizo	250	250
Alimento vivo (rotíferos y artemias)	500	0

Elaborado: Qco. Leenin Flores Ramos
Fecha: Julio 2015

Revisado: M.Sc. María Elena Jacinto Tayco
Fecha: Setiembre 2015

Autorizado: Ing. Lili Carrera Santos
Director DGIA
Fecha: Setiembre 2015



PROTOCOLO
-IMARPE-

DGIA / LB/02.01/PR

**PROTOCOLO DE DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS
TOTALES EN TEJIDO DE ORGANISMOS ACUÁTICOS**

Edición: 01
Revisión: 0
Fecha : 07/09/2015
Página 4 de 6

6.2 CURVA DE CALIBRACIÓN

- La curva de calibración se prepara a partir de una solución patrón de 600 µg/mL de suero albúmina de bovina (BSA), del cual se prepara 10 mL de una solución 1:1 de BSA 600 µg/mL con NaOH 1N obteniendo el patrón de BSA 300 µg/mL en NaOH 0.5 N, a partir de la cual se hace un gradiente de concentración desde 0 a 150 µg/mL de BSA en tubos de ensayo (Tabla 2).

Tabla 2. Cantidades para la curva de calibración

TUBO	VOLUMEN BSA (300 µg/mL) (µL)	VOLUMEN NaOH 0.5N (µL)	CONCENTRACIÓN BSA (µg/mL)
Blanco	0	1000	0
1	100	900	30
2	200	800	60
3	300	700	90
4	400	600	120
5	500	500	150

- Incube las muestras, blanco de reactivo y estándares en un termobañero a 30 °C durante 16 h, luego se continúa con los procesos que se describen a partir del ítem 6.3.a en paralelo con las muestras y el blanco de reactivos.

6.3 ENSAYO DE PROTEÍNAS, método adaptado de Hartree-Lowry 1972

- Añada 0.9 mL del Reactivo A, a cada estándar, muestra, blanco de reactivos y mezcle con el vórtex.
- Incube los tubos en Termo-bañero a 50 °C durante 10 min y deje enfriar a temperatura ambiente.
- Adicione 0.1 mL del Reactivo B a cada tubo, mezcle con el vórtex y deje reposar durante 10 min a temperatura ambiente.
- Añada rápidamente 3 mL del Reactivo C a cada tubo, mezcle con el vórtex y deje reposar a temperatura ambiente durante 20 min.
- Las absorbancias se leen en un espectrofotómetro UV-Vis a una longitud de onda de 650 nm.

6.4 CONTROL DE CALIDAD.

El duplicado de la muestra deberá tener una desviación estándar relativa porcentual (RSD%) menor a 4%, en caso contrario se repite la prueba.

7. PROCESAMIENTO DE DATOS Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Para obtener el porcentaje de proteínas en la muestra se calcula mediante la fórmula:

$$\% \text{ Proteinas} = \frac{C * V_E}{P_S * V_a * 1000000} * 100$$



PROTOCOLO
-IMARPE-

DGIA / LB/02.01/PR

**PROTOCOLO DE DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS
TOTALES EN TEJIDO DE ORGANISMOS ACUÁTICOS**

Edición: 01
Revisión: 0
Fecha : 07/09/2015
Página 5 de 6

Dónde:

C_m = Concentración de proteínas de la curva de calibración ($\mu\text{g/mL}$)

V_E = Volumen de extracción (mL)

P_s = Peso de la microalga liofilizada (g)

V_a = Volumen de alícuota (mL)

Proteínas					
	W muestra (g)				
A		$V_{\text{extracción}}$ (mL)			
B		$V_{\text{alícuota}}$ (mL)			
Curva de calibración					
C ($\mu\text{g/mL}$)	Abs	Pendiente (m)			
0		Intercepto (b)			
30					
60		Coefficiente (R^2)			
90					
120					
150					
Blanco					
Réplica	Abs	C ($\mu\text{g/mL}$)	W proteína extracto (μg)	W muestra (μg)	%Proteínas (w/w)
A					
B					
				Promedio	
				RSD%	

8. FORMATO DE REGISTRO DE DATOS LB / F – PR 02.01

9. BIBLIOGRAFIA

Arredondo, B. O., & Voltolina, D. (2007). Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal. México: Centro de Investigaciones Biológicas del Noereste.

Hartree, E. F. (1972). Determination of protein: a modification of Lowry method that gives a linear photometric response. Analytical Biochemistry, 48: 422-427.

Prieto Guevara, M. J. (2006). Alimento vivo y su importancia en la acuicultura. Revista Electronica de Ingenieria en Produccion Acuicola, Vol. 2 Núm. 2.

UNIVERSIDAD NACIONAL ABIERTA Y A DISTANCIA. (s.f.). unad. Recuperado el 22 de Febrero de 2016, de http://datateca.unad.edu.co/contenidos/301106/EXE_301106/21_estructura_del_tejido_muscular_del_pescado.html

Elaborado: Qco. Leenin Flores Ramos
Fecha: Julio 2015

Revisado: M.Sc. María Elena Jacinto Tayco
Fecha: Setiembre 2015

Autorizado: Ing. Lili Carrera Santos
Director DGIA
Fecha: Setiembre 2015



PROTOCOLO
-IMARPE-

DGIA / LB/02.01/PR

PROTOCOLO DE DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS
TOTALES EN TEJIDO DE ORGANISMOS ACUÁTICOS

Edición: 01
Revisión: 0
Fecha : 07/09/2015
Página 6 de 6

Elaborado: Qco. Leenin Flores Ramos
Fecha: Julio 2015

Revisado: M.Sc. María Elena Jacinto Tayco
Fecha: Setiembre 2015

Autorizado: Ing. Lili Carrera Santos
Director DGIA
Fecha: Setiembre 2015



PROTOCOLO DE DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS TOTALES EN MICROALGAS LIOFILIZADAS

CÓDIGO: DGIA/LB/02.01/CH

Rev. N°.	Fecha	Descripción de la Modificación	Edición	Aprobado por
0	2/09/2015		01	

DISTRIBUIDO A:

DEC		DGIA		AFIA	
-----	--	------	--	------	--

Copia No:

ESTA ES UNA COPIA CONTROLADA, SALVO SE INDIQUE DE OTRA MANERA.

Elaborado: Qco. Leenin Flores Ramos Fecha: Julio 2015	Revisado: M.Sc. María Elena Jacinto Tayco Fecha: Setiembre 2015	Autorizado: Ing. Lili Carrera Santos Director DGIA Fecha: Setiembre 2015
---	---	---



PROTOCOLO
-IMARPE-

DGIA / LB/02.01/PR

**PROTOCOLO DE DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS
TOTALES EN MICROALGAS LIOFILIZADAS**

Edición: 01
Revisión: 0
Fecha : 07/09/2015
Página 2 de 6

1. OBJETIVO:

Determinar el porcentaje de carbohidratos totales en muestra de microalga liofilizada por espectrofotometría UV-Vis usando el método Dubois, 1956.

2. ALCANCE:

Esta técnica se aplica a muestras de microalgas marinas y continentales liofilizadas.

3. TÉRMINOS Y DEFINICIONES

Microalgas: Microorganismos fotosintéticos del orden de las micras en unidad de medidas, pueden ser unicelulares, filamentosas ó coloniales, presentan como estructura externa membrana y/o pared celular ó exoesqueleto de sílice, son, además, capaces de transformar el CO₂ en biomasa orgánica.

Liofilización: Es un proceso de deshidratación de productos bajo baja presión (vacío) y moderada temperatura. En la liofilización no ocurre la evaporación del agua a partir del estado líquido - normal en procesos de secados - sino la sublimación del hielo.

4. RESPONSABILIDADES

El Responsable o Jefe de Laboratorio:

- 4.1 Es responsable de asegurar el cumplimiento del presente protocolo.
- 4.2 Supervisa que los controles de calidad se realicen.
- 4.3 Supervisa el correcto ingreso de datos de los registros internos de trabajo.
- 4.4 Designa y autoriza al personal capacitado para manejar el equipo.

El Analista:

- 4.5 Aplica el presente protocolo.
- 4.6 Realiza el mantenimiento externo del equipo y sus componentes.
- 4.7 Ingresar los datos en la hoja de cálculo.
- 4.8 Elabora el informe de ensayo.
- 4.8 Llena los registros internos de trabajo.

5. EQUIPOS Y MATERIALES

5.1 EQUIPOS

- Espectrofotómetro UV-Visible Varian Cary 50
- Centrífuga refrigerada Eppendorf Centrifuge 5702R
- Balanza analítica de 220 g de 5 decimales Sartorius MSU225S-000-DU
- Campana extractora de gases Labconco
- Vortex VELP Scientifica Wizard
- Termobañó (baño maría) MRC BH-200
- Baño de ultrasonido Branson 2510

5.2 MATERIALES

- Micropipeta de rango variable 100-1000 µL.
- Tubos de ensayo de 10 mL con tapa de teflón.

Elaborado: Qco. Leenin Flores Ramos
Fecha: Julio 2015

Revisado: M.Sc. María Elena Jacinto Tayco
Fecha: Setiembre 2015

Autorizado: Ing. Lili Carrera Santos
Director DGIA
Fecha: Setiembre 2015

	PROTOCOLO -IMARPE-	DGIA / LB/02.01/PR
	PROTOCOLO DE DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS TOTALES EN MICROALGAS LIOFILIZADAS	Edición: 01 Revisión: 0 Fecha : 07/09/2015 Página 3 de 6

- Tubos de ensayo de 15 mL con tapa.
- Pipeta graduada de 1 mL.
- Pipeta graduada de 5 mL.

5.3 REACTIVOS

- Patrón de glucosa anhidra 200 µg/mL: Disuelva 20 mg de glucosa anhidra con agua ultrapura en una fiola de 100 mL.
- Ácido sulfúrico 1.0 M: Prepare a partir de ácido sulfúrico 96-97% P.A. y agua ultrapura.
- Fenol 5% (w/v): Prepare 25 mL para el análisis a partir de fenol P.A. y agua ultrapura.
- Sulfato de hidracina 0.5% (w/v) en ácido sulfúrico concentrado: se prepara 100 mL para el análisis a partir de sulfato de hidracina P.A. y ácido sulfúrico 96-97% P.A.

6. PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

6.1 EXTRACCIÓN DE CARBOHIDRATOS

- Etiquete todos los tubos con marcador indeleble y coloque cinta adhesiva transparente alrededor de la marca para evitar que se borre durante el tratamiento del termo-baño.
- Pese 5 mg de biomasa liofilizada en un tubo de ensayo de 10 mL con tapa, por triplicado. Prepare 1 tubo sin muestra que será el blanco de reactivos.
- Agregue 5 mL de H₂SO₄ 1.0 M a cada tubo incluyendo el blanco de reactivos y mantenga a temperatura ambiente hasta que todos los tubos contengan ácido.
- Homogenice los tubos de ensayo en un baño de ultrasonido durante 15 min.
- Coloque los tubos en un termo-baño a 100 °C durante 1 h.
- Retire los tubos del termo-baño y déjelos en reposo hasta que alcancen la temperatura ambiente.
- Homogenice nuevamente los tubos de ensayo en un baño de ultrasonido durante 15 min para mejorar la extracción.
- Centrifugue los tubos a 4000 rpm y 4 °C por 15 min.
- Del extracto ácido total obtenido, se recomienda tomar 3 volúmenes diferentes, midiendo con una micropipeta 100, 250 y 500 µL y se les completa a 1 mL con agua ultrapura (Cada volumen en un tubo de cristal, debidamente etiquetado). Estas muestras se agitan con el vortex para su total homogenización, y sirven para asegurar que al menos una de las concentraciones obtendrá una absorbancia en el rango de trabajo de la curva de calibración. Si no fuere así tomar un volumen que permita que la señal se encuentre dentro de la curva de calibración.

6.2 CURVA DE CALIBRACIÓN

- La curva de calibración se prepara a partir de una solución concentrada de 200 µg/mL de glucosa anhidra, de la cual se hace un gradiente de concentración desde 0 a 100 µg/mL en tubos de ensayo de 15mL con tapa (Tabla 1).

Elaborado: Qco. Leenin Flores Ramos Fecha: Julio 2015	Revisado: M.Sc. María Elena Jacinto Tayco Fecha: Setiembre 2015	Autorizado: Ing. Lili Carrera Santos Director DGIA Fecha: Setiembre 2015
---	---	---



PROTOCOLO
-IMARPE-

DGIA / LB/02.01/PR

**PROTOCOLO DE DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS
TOTALES EN MICROALGAS LIOFILIZADAS**

Edición: 01
Revisión: 0
Fecha : 07/09/2015
Página 4 de 6

- Una vez preparado los estándares, se continúa con los procesos que se describen a partir del ítem 6.3.a en paralelo con las muestras y el blanco de reactivos.

Tabla 1. Cantidades para la curva de calibración

TUBO	VOLUMEN GLUCOSA (200 µg/mL) (µL)	VOLUMEN H ₂ O ultrapura (µL)	CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA (µg/mL)
Blanco	0	1000	0
1	100	900	20
2	200	800	40
3	300	700	60
4	400	600	80
5	500	500	100

6.3 ENSAYO DE CARBOHIDRATOS, método adaptado de Dubois 1956

- Añada 1 mL de fenol 5 % a cada estándar, muestra y blanco de reactivos.
- Mezcle con el vortex y deje reposar 40 min.
- Añada lentamente en la campana de extracción 5 mL sulfato de hidracina 0.5 % en ácido sulfúrico por las paredes del tubo, para evitar pérdidas por evaporación. Tenga cuidado ya que es una reacción bastante exotérmica.
- Mezcle en el vortex y deje enfriar a temperatura ambiente.
- Lea las absorbancias en un espectrofotómetro UV-Vis a una longitud de onda de 485 nm.

6.4 CONTROL DE CALIDAD.

El duplicado de la muestra deberá tener una desviación estándar relativa porcentual (RSD%) menor a 4%, en caso contrario se repite la prueba.

7. PROCESAMIENTO DE DATOS Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Para obtener el porcentaje de carbohidratos en la muestra se calcula mediante la fórmula:

$$\% \text{ Carbohidratos} = \frac{C * V_E}{P_s * V_a * 1000000} * 100$$

Dónde:

C_m = Concentración de carbohidratos de la curva de calibración (µg/mL)

V_E = Volumen de extracción (mL)

P_s = Peso de la microalga liofilizada (g)

V_a = Volumen de alicuota (mL)



PROTOCOLO
-IMARPE-

DGIA / LB/02.01/PR

**PROTOCOLO DE DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS
TOTALES EN MICROALGAS LIOFILIZADAS**

Edición: 01
Revisión: 0
Fecha : 07/09/2015
Página 5 de 6

8. FORMATO DE REGISTRO DE DATOS LB / F – CH 02.01

Carbohidratos					
	W muestra (g)		$V_{extracción}$ (mL)		
A			$V_{alícuota}$ (mL)		
B					
Curva de calibración					
C (µg/mL)	Abs		Pendiente (m)		
0			Intercepto (b)		
30					
60			Coefficiente (R ²)		
90					
120					
150					
Blanco					
Réplica	Abs	C (µg/mL)	W carbohidrato extracto (µg)	W muestra (µg)	%carbohidrato (w/w)
A					
B					
				Promedio	
				RSD%	

9. BIBLIOGRAFIA

- Arredondo, B. O., & Voltolina, D. (2007). Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal. México: Centro de Investigaciones Biológicas del Noereste.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. Anal. Chem., 28 (3), pp 350–356.



PROTOCOLO
-IMARPE-

DGIA / LB/02.01/PR

PROTOCOLO DE DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS
TOTALES EN MICROALGAS LIOFILIZADAS

Edición: 01
Revisión: 0
Fecha : 07/09/2015
Página 6 de 6

Elaborado: Qco. Leenin Flores Ramos
Fecha: Julio 2015

Revisado: M.Sc. María Elena Jacinto Tayco
Fecha: Setiembre 2015

Autorizado: Ing. Lili Carrera Santos
Director DGIA
Fecha: Setiembre 2015



PROTOCOLO DE DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS TOTALES EN TEJIDO DE ORGANISMOS ACUÁTICOS

CÓDIGO: DGIA/LB/02.01/CH

Rev. N°.	Fecha	Descripción de la Modificación	Edición	Aprobado por
0	2/09/2015		01	

DISTRIBUIDO A:

DEC	DGIA	AFIA
-----	------	------

Copia No:

ESTA ES UNA COPIA CONTROLADA, SALVO SE INDIQUE DE OTRA MANERA.

Elaborado: Qco. Leenin Flores Ramos Fecha: Julio 2015	Revisado: M.Sc. María Elena Jacinto Tayco Fecha: Setiembre 2015	Autorizado: Ing. Lili Carrera Santos Director DGIA Fecha: Setiembre 2015
---	---	---



PROTOCOLO
-IMARPE-

DGIA / LB/02.01/PR

**PROTOCOLO DE DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS
TOTALES EN TEJIDO DE ORGANISMOS ACUÁTICOS**

Edición: 01
Revisión: 0
Fecha : 07/09/2015
Página 2 de 6

1. OBJETIVO:

Determinar el porcentaje de carbohidratos totales en muestra de tejido de organismos acuáticos por espectrofotometría UV-Vis usando el método Dubois, 1956.

2. ALCANCE:

Esta técnica se aplica a muestras de tejidos de peces, ovocitos y larvas de peces, gónadas de erizo y alimento vivo.

3. TÉRMINOS Y DEFINICIONES

Tejido de pez: La musculatura del pescado está constituida por un sistema que va a lo largo en forma paralela, de todo el cuerpo, el cual se halla dividido en dirección dorsoventral por las apófisis vertebrales y radios de las aletas y en sentido horizontal por las paredes divisiones o septas (tabiques de tejido conectivo o miocomata).

Alimento vivo: Describe el grupo de organismos planctónicos que constituyen la base en la alimentación de los estadios larvarios de los crustáceos, las postlarvas de peces y las diferentes fases en el desarrollo de los moluscos. Entre el zooplancton se destacan organismos tales como las artemias y los rotíferos.

4. RESPONSABILIDADES

El Responsable o Jefe de Laboratorio:

- 4.1 Es responsable de asegurar el cumplimiento del presente protocolo.
- 4.2 Supervisa que los controles de calidad se realicen.
- 4.3 Supervisa el correcto ingreso de datos de los registros internos de trabajo.
- 4.4 Designa y autoriza al personal capacitado para manejar el equipo.

El Analista:

- 4.5 Aplica el presente protocolo.
- 4.6 Realiza el mantenimiento externo del equipo y sus componentes.
- 4.7 Ingresa los datos en la hoja de cálculo.
- 4.8 Elabora el informe de ensayo.
- 4.8 Llena los registros internos de trabajo.

5. EQUIPOS Y MATERIALES

5.1 EQUIPOS

- Espectrofotómetro UV-Visible Varian Cary 50
- Centrífuga refrigerada Eppendorf Centrifuge 5702R
- Balanza analítica de 220 g de 5 decimales Sartorius MSU225S-000-DU
- Campana extractora de gases Labconco
- Vortex VELP Scientifica Wizard
- Termobañó (baño maría) MRC BH-200
- Baño de ultrasonido Branson 2510

5.2 MATERIALES

- Micropipeta de rango variable 100-1000 µL.

Elaborado: Qco. Leenin Flores Ramos
Fecha: Julio 2015

Revisado: M.Sc. María Elena Jacinto Tayco
Fecha: Setiembre 2015

Autorizado: Ing. Lili Carrera Santos
Director DGIA
Fecha: Setiembre 2015



PROTOCOLO
-IMARPE-

DGIA / LB/02.01/PR

**PROTOCOLO DE DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS
TOTALES EN TEJIDO DE ORGANISMOS ACUÁTICOS**

Edición: 01
Revisión: 0
Fecha : 07/09/2015
Página 3 de 6

- Tubos de ensayo de 10 mL con tapa de teflón.
- Tubos de ensayo de 15 mL con tapa.
- Pipeta graduada de 1 y 10 mL.

5.3 REACTIVOS

- Patrón de glucosa anhidra 200 µg/mL: Disuelva 20mg de glucosa anhidra con agua ultrapura en una fiola de 100 mL.
- Fenol 5% (w/v): Prepare 25 mL para el análisis a partir de fenol P.A. y agua ultrapura.
- Sulfato de hidracina 0,5 % (w/v) en ácido sulfúrico concentrado: se prepara 100 mL para el análisis a partir de sulfato de hidracina P.A. y ácido sulfúrico 96-97% P.A.

6. PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

6.1 EXTRACCIÓN DE CARBOHIDRATOS

- Pese 50 mg de tejido en un tubo de ensayo de 10mL con tapa, repita esta operación 2 veces (duplicado) por cada muestra a analizar. Prepare 1 tubo sin muestra que será el blanco de reactivos.
- Agregue 10 mL de agua ultrapura a cada tubo, incluyendo el blanco de reactivo.
- Homogenice los tubos de ensayo en baño de hielo mediante ultrasonido a una potencia de 125 W durante 1 min.
- Transfiere 1 mL de la solución a a otro tubo de 15 mL limpio y etiquete con la misma información registrada en el tubo donde se realizó la homogenización.

6.2 CURVA DE CALIBRACIÓN

- La curva de calibración se prepara a partir de una solución concentrada de 200 µg/mL de glucosa anhidra, de la cual se hace un gradiente de concentración desde 0 a 100 µg/mL en tubos de ensayo de 15mL con tapa (Tabla 1).
- Una vez preparado los estándares, se continúa con los procesos que se describen a partir del ítem 6.3.a en paralelo con las muestras y el blanco de reactivos.

Tabla 1. Cantidades para la curva de calibración

TUBO	VOLUMEN GLUCOSA (200 µg/mL) (µL)	VOLUMEN H ₂ O ultrapura (µL)	CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA (µg/mL)
Blanco	0	1000	0
1	100	900	20
2	200	800	40
3	300	700	60
4	400	600	80
5	500	500	100



PROCOLO
-IMARPE-

DGIA / LB/02.01/PR

**PROCOLO DE DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS
TOTALES EN TEJIDO DE ORGANISMOS ACUÁTICOS**

Edición: 01
Revisión: 0
Fecha : 07/09/2015
Página 4 de 6

6.3 ENSAYO DE CARBOHIDRATOS, método adaptado de Dubois 1956

- Añada 1 mL de fenol 5% a cada estándar, muestra y blanco de reactivos.
- Mezcle con el vórtex y deje reposar 40 min.
- Añada lentamente en la campana de extracción 5 mL sulfato de hidracina 0.5% en ácido sulfúrico por las paredes del tubo, para evitar pérdidas por evaporación. Tenga cuidado ya que es una reacción bastante exotérmica.
- Mezcle en el vórtex y deje enfriar a temperatura ambiente.
- Lea las absorbancias en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 485 nm.

6.4 CONTROL DE CALIDAD.

El duplicado de la muestra deberá tener una desviación estándar relativa porcentual (RSD%) menor a 4%, en caso contrario se repite la prueba.

7. PROCESAMIENTO DE DATOS Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Para obtener el porcentaje de carbohidratos en la muestra se calcula mediante la fórmula:

$$\% \text{ Carbohidratos} = \frac{C * V_E}{P_s * V_a * 1000000} * 100$$

Dónde:

C_m = Concentración de carbohidratos de la curva de calibración ($\mu\text{g/mL}$)

V_E = Volumen de extracción (mL)

P_s = Peso de la microalga liofilizada (g)

V_a = Volumen de alicuota (mL)



PROTOCOLO
-IMARPE-

DGIA / LB/02.01/PR

**PROTOCOLO DE DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS
TOTALES EN TEJIDO DE ORGANISMOS ACUÁTICOS**

Edición: 01
Revisión: 0
Fecha : 07/09/2015
Página 5 de 6

8. FORMATO DE REGISTRO DE DATOS LB / F – CH 02.01

Carbohidratos					
	W muestra (g)			$V_{extraccion}$ (mL)	
A				$V_{aliquota}$ (mL)	
B					
Curva de calibración					
C (µg/mL)	Abs			Pendiente (m)	
0				Intercepto (b)	
30					
60				Coeficiente (R ²)	
90					
120					
150					
Blanco					
Réplica	Abs	C (µg/mL)	W carbohidrato extracto (µg)	W muestra (µg)	%carbohidrato (w/w)
A					
B					
				Promedio	
				RSD%	

9. BIBLIOGRAFIA

- Arredondo, B. O., & Voltolina, D. (2007). Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal. México: Centro de Investigaciones Biológicas del Noereste.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. Anal. Chem., 28 (3), pp 350–356.



PROTOCOLO
-IMARPE-

DGIA / LB/02.01/PR

PROTOCOLO DE DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS
TOTALES EN TEJIDO DE ORGANISMOS ACUÁTICOS

Edición: 01
Revisión: 0
Fecha : 07/09/2015
Página 6 de 6

Elaborado: Qco. Leenin Flores Ramos
Fecha: Julio 2015

Revisado: M.Sc. María Elena Jacinto Tayco
Fecha: Setiembre 2015

Autorizado: Ing. Lili Carrera Santos
Director DGIA
Fecha: Setiembre 2015



PROTOCOLO DE DETERMINACIÓN DE LÍPIDOS TOTALES EN MICROALGAS LIOFILIZADAS

CÓDIGO: DGIA/LB/02.01/LP

Rev. N°.	Fecha	Descripción de la Modificación	Edición	Aprobado por
0	2/09/2015		01	

DISTRIBUIDO A:

DEC		DGIA		AFIA	
-----	--	------	--	------	--

Copia No:

ESTA ES UNA COPIA CONTROLADA, SALVO SE INDIQUE DE OTRA MANERA.

Elaborado: Qco. Leenin Flores Ramos Fecha: Julio 2015	Revisado: M.Sc. María Elena Jacinto Tayco Fecha: Setiembre 2015	Autorizado: Ing. Lili Carrera Santos Director DGIA Fecha: Setiembre 2015
---	---	---

	PROTOCOLO -IMARPE-	DGIA / LB/02.01/PR
	PROTOCOLO DE DETERMINACIÓN DE LÍPIDOS TOTALES EN MICROALGAS LIOFILIZADAS	Edición: 01 Revisión: 0 Fecha : 07/09/2015 Página 2 de 4

1. OBJETIVO:

Determinar el contenido lípidos totales en microalgas, mediante extracción directa con solventes orgánicos.

2. ALCANCE:

Esta técnica se aplica a muestras de microalgas marinas y continentales previamente liofilizadas.

3. TÉRMINOS Y DEFINICIONES

Microalgas: Microorganismos fotosintéticos del orden de las micras en unidad de medidas, pueden ser unicelulares, filamentosas ó coloniales, presentan como estructura externa membrana y/o pared celular ó exoesqueleto de sílice, son, además, capaces de transformar el CO₂ en biomasa orgánica.

Biomasa microalgal: Sustancia orgánica constituida por células de microalgas capaces de generar energía.

Lípidos Totales: Los lípidos son compuestos orgánicos, constituidos principalmente por carbono, hidrógeno y oxígeno, a veces por azufre, fosforo y nitrógeno. Son de diferentes tipos como; aceites, esteres y fosfolípidos. Se le denomina lípidos totales al conjunto de estos compuestos orgánicos que puedan estar presentes en la biomasa algal con la que se trabaje.

4. RESPONSABILIDADES

El Responsable o Jefe de Laboratorio:

- 4.1 Es responsable de asegurar el cumplimiento del presente protocolo.
- 4.2 Supervisa que los controles de calidad se realicen.
- 4.3 Supervisa el correcto ingreso de datos de los registros internos de trabajo.
- 4.4 Designa y autoriza al personal capacitado para manejar el equipo.

El Analista:

- 4.5 Aplica el presente protocolo.
- 4.6 Realiza el mantenimiento externo del equipo y sus componentes.
- 4.7 Ingresa los datos en la hoja de cálculo.
- 4.8 Elabora el informe de ensayo.
- 4.8 Llena los registros internos de trabajo.

5. EQUIPOS Y MATERIALES

5.1 EQUIPOS

- Balanza analítica de 220 g de 5 decimales Sartorius MSU225S-000-DU
- Centrifuga refrigerada Eppendorf Centrifuge 5702R
- Campana extractora de gases Labconco
- Baño de ultrasonido Branson 2510
- Vortex VELP Scientifica Wizard

Elaborado: Qco. Leenin Flores Ramos Fecha: Julio 2015	Revisado: M.Sc. María Elena Jacinto Tayco Fecha: Setiembre 2015	Autorizado: Ing. Lili Carrera Santos Director DGIA Fecha: Setiembre 2015
---	---	---



PROTOCOLO
-IMARPE-

DGIA / LB/02.01/PR

**PROTOCOLO DE DETERMINACIÓN DE LÍPIDOS TOTALES EN
MICROALGAS LIOFILIZADAS**

Edición: 01
Revisión: 0
Fecha : 07/09/2015
Página 3 de 4

- Bomba de vacío Vacuubrand MZ 2C
- Evaporador/concentrador para viales de 4 mL Glas-Col

5.2 MATERIALES

- Micropipeta de 10 μ L-100 μ L
- Micropipeta de 100 μ L-1000 μ L
- Tubos de ensayo de 10 mL con tapa de teflón
- Viales de 4 mL
- Pipetas graduadas de 2 y 3 mL.

5.3 REACTIVOS

- Cloroformo grado P.A.
- Metanol grado HPLC.
- Nitrógeno gas extrapuro.

6. PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

6.1 ENSAYO DE LÍPIDOS TOTALES, método adaptado de Bligh & Dyer

- Pese 25 mg de microalgas liofilizadas en un tubo de vidrio de vidrio de 10 mL (Tubo N° 1). Se adiciona 3 mL de una mezcla de solventes Cloroformo (C): Metanol (M) 1:2, método de Bligh y Dyer. Este procedimiento se hace por duplicado.
- Coloque el tubo N° 1 en un baño de agua con hielo, el cual es sometido a ultrasonido durante 15 min (3 veces).
- Almacene el tubo N° 1 por 16 h en refrigeración (4 °C) y protegido a la luz, de esa manera se favorece la extracción completa de los lípidos.
- Vuelva a someter el tubo N° 1 a ultrasonido con baño de hielo por 15 min (3 veces).
- Centrifugue el tubo N° 1 a 4000 rpm por 20 minutos a 4 °C.
- Recupere el extracto con una pipeta Pasteur y transfíralo a un tubo de vidrio de 10 mL (Tubo N° 2). Agregue 1.5 mL de la mezcla C:M 1:2 a la biomasa residual (Tubo N° 1) y centrifugue nuevamente a 4000 rpm por 20 min a 4 °C y recupere el extracto en el Tubo N° 2.
- Agregue 2 mL de agua ultrapura al tubo N° 2 que contiene el extracto.
- Agite el tubo N° 2 con el vórtex alrededor de 30 segundos, luego centrifugue a 4000 rpm por 10 minutos a 4 °C.
- Separe la fase inferior formada de Cloroformo y lípidos del tubo N° 2 introduciendo con cuidado una pipeta Pasteur y burbujeando aire hasta el fondo del tubo. Coloque la fase de cloroformo en un vial de 4 mL, limpio, seco y pesado.
- Agregue 1 mL más de Cloroformo al tubo N° 2 y repita los 2 pasos anteriores.
- En la campana de extracción, seque la fase Cloroformo: lípido del vial de 4 mL con el evaporador/concentrador.
- Coloque el vial seco en un desecador y déjelo en vacío y protegido de la luz hasta el día siguiente y pese el contenido.



**PROTOCOLO
-IMARPE-**

DGIA / LB/02.01/PR

**PROTOCOLO DE DETERMINACIÓN DE LÍPIDOS TOTALES EN
MICROALGAS LIOFILIZADAS**

Edición: 01
Revisión: 0
Fecha : 07/09/2015
Página 4 de 4

6.2 CONTROL DE CALIDAD

El duplicado de la muestra deberá tener una desviación estándar relativa porcentual (RSD%) menor a 4%, en caso contrario se repite la prueba.

7. PROCESAMIENTO DE DATOS Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Para obtener el porcentaje de carbohidratos en la muestra se calcula mediante la fórmula:

$$\%Lípidos = \left(\frac{W_2 - W_1}{W_m} \right) * 100\%$$

W_2 = Peso del vial con los lípidos secos (mg).

W_1 = Peso del vial (mg).

W_m = Peso de la muestra (mg)

8. FORMATO DE REGISTRO DE DATOS LB / F – CH 02.01

Lípidos					
Réplica	W muestra (g)	W vial (g)	W vial+lípidos (g)	W lípidos (g)	%Lípidos (w/w)
				Promedio	
				Des.Est	

9. BIBLIOGRAFIA

Arredondo, B. O., & Voltolina, D. (2007). Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal. México: Centro de Investigaciones Biológicas del Noereste.



PROTOCOLO DE DETERMINACIÓN DE LÍPIDOS TOTALES EN TEJIDO DE ORGANISMOS ACUÁTICOS

CÓDIGO: DGIA/LB/02.01/LP

Rev. N°.	Fecha	Descripción de la Modificación	Edición	Aprobado por
0	2/09/2015		01	

DISTRIBUIDO A:

DEC		DGIA		AFIA	
-----	--	------	--	------	--

Copia No:

ESTA ES UNA COPIA CONTROLADA, SALVO SE INDIQUE DE OTRA MANERA.

Elaborado: Qco. Leenin Flores Ramos Fecha: Julio 2015	Revisado: M.Sc. María Elena Jacinto Tayco Fecha: Setiembre 2015	Autorizado: Ing. Lili Carrera Santos Director DGIA Fecha: Setiembre 2015
---	---	---



PROTOCOLO
-IMARPE-

DGIA / LB/02.01/PR

**PROTOCOLO DE DETERMINACIÓN DE LÍPIDOS TOTALES EN
TEJIDO DE ORGANISMOS ACUÁTICOS**

Edición: 01
Revisión: 0
Fecha : 07/09/2015
Página 2 de 4

1. OBJETIVO:

Determinar el contenido de lípidos totales en muestra de tejido de organismos acuáticos mediante extracción directa con solventes orgánicos.

2. ALCANCE:

Esta técnica se aplica a muestras de tejidos de peces, ovocitos y larvas de peces, gónadas de erizo y alimento vivo.

3. TÉRMINOS Y DEFINICIONES

Tejido de pez: La musculatura del pescado está constituida por un sistema que va a lo largo en forma paralela, de todo el cuerpo, el cual se halla dividido en dirección dorsoventral por las apófisis vertebrales y radios de las aletas y en sentido horizontal por las paredes divisiones o septas (tabiques de tejido conectivo o miocomata).

Alimento vivo: Describe el grupo de organismos planctónicos que constituyen la base en la alimentación de los estadios larvarios de los crustáceos, las postlarvas de peces y las diferentes fases en el desarrollo de los moluscos. Entre el zooplancton se destacan organismos tales como las artemias y los rotíferos.

4. RESPONSABILIDADES

El Responsable o Jefe de Laboratorio:

- 4.1 Es responsable de asegurar el cumplimiento del presente protocolo.
- 4.2 Supervisa que los controles de calidad se realicen.
- 4.3 Supervisa el correcto ingreso de datos de los registros internos de trabajo.
- 4.4 Designa y autoriza al personal capacitado para manejar el equipo.

El Analista:

- 4.5 Aplica el presente protocolo.
- 4.6 Realiza el mantenimiento externo del equipo y sus componentes.
- 4.7 Ingresa los datos en la hoja de cálculo.
- 4.8 Elabora el informe de ensayo.
- 4.8 Llena los registros internos de trabajo.

5. EQUIPOS Y MATERIALES

5.1 EQUIPOS

- Balanza analítica de 220 g de 5 decimales Sartorius MSU225S-000-DU
- Centrífuga refrigerada Eppendorf Centrifuge 5702R
- Campana extractora de gases LABCONCO.
- Vórtex Velp Scientifica Wizard
- Ultrasonido QSonica Q125.
- Bomba de vacío Vacuubrand MZ 2C
- Evaporador/concentrador para viales de 4 mL Glas-Col
- Baño de ultrasonido Branson 2510



PROCOLO
-IMARPE-

DGIA / LB/02.01/PR

**PROCOLO DE DETERMINACIÓN DE LÍPIDOS TOTALES EN
TEJIDO DE ORGANISMOS ACUÁTICOS**

Edición: 01
Revisión: 0
Fecha : 07/09/2015
Página 3 de 4

5.2 MATERIALES

- Viales de 20 mL.
- Viales de 4 mL.
- Tubos de ensayo de 10 mL con tapa de teflón.
- Tubos de ensayo de 15 mL con tapa.
- Pipetas graduadas de 10 mL.
- Filtro rápido Whatman 541
- Embudo de vidrio $\varnothing = 75$ mm.

5.3 REACTIVOS

- Cloroformo grado P.A.
- Metanol grado HPLC.
- Cloruro de Potasio P.A.
- Nitrógeno gas extrapuro.

6. PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

6.1 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

- Pese 0.5 g de muestra del tejido en un vial de 20 mL y adicione 10 mL de una mezcla de solventes Cloroformo (C): Metanol (M) 2:1, método de Folch-Lee. Este procedimiento se hace por duplicado.
- Coloque el vial de 20 mL con muestra en hielo, y homogenice con ultrasonido a una potencia de 125 W durante 1 min.
- Filtre la solución homogenizada usando filtros lavados previamente con 7 mL de una mezcla de C:M (2:1) y recoja el filtrado en un tubo de 15 mL con tapa.(Tubo N°1).
- Añade KCl 0.88 % (1/4 del volumen total de la mezcla C:M) al Tubo N° 1, y agite el tubo con el vórtex alrededor de 60 segundos.
- Trasvase a un tubo de 10 mL con tapa de teflón (Tubo N° 2) y luego centrifugue a 1500 rpm durante 10 minutos a 20 °C.
- Separe la fase inferior formada de Cloroformo y lípidos del Tubo N° 2 introduciendo con cuidado una pipeta Pasteur y burbujeando aire hasta el fondo del tubo. Coloque la fase orgánica en un vial de 4 mL, limpio, seco y pesado.
- En la campana de extracción, seque la fase Cloroformo: lípido con el evaporador/ concentrador.
- Coloque el vial en un desecador y déjelo en vacío protegido de la luz hasta el día siguiente y pese el contenido.

6.2 CONTROL DE CALIDAD

El duplicado de la muestra deberá tener una desviación estándar relativa porcentual (RSD%) menor a 4%, en caso contrario se repite la prueba.

7. PROCESAMIENTO DE DATOS Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Para obtener el porcentaje de carbohidratos en la muestra se calcula mediante la fórmula:

Elaborado: Qco. Leenin Flores Ramos
Fecha: Julio 2015

Revisado: M.Sc. María Elena Jacinto Tayco
Fecha: Setiembre 2015

Autorizado: Ing. Lili Carrera Santos
Director DGIA
Fecha: Setiembre 2015



PROTOCOLO
-IMARPE-

DGIA / LB/02.01/PR

**PROTOCOLO DE DETERMINACIÓN DE LÍPIDOS TOTALES EN
TEJIDO DE ORGANISMOS ACUÁTICOS**

Edición: 01
Revisión: 0
Fecha : 07/09/2015
Página 4 de 4

$$\%Lípidos = \left(\frac{W_2 - W_1}{W_m} \right) * 100\%$$

W_2 = Peso del vial con los lípidos secos (mg).

W_1 = Peso del vial (mg).

W_m = Peso de la muestra (mg)

8. FORMATO DE REGISTRO DE DATOS LB / F – CH 02.01

Lípidos					
Réplica	W muestra (g)	W vial (g)	W vial+lípidos (g)	W lípidos (g)	%Lípidos (w/w)
				Promedio	
				Des.Est	

9. BIBLIOGRAFIA

Folch, J., Lees, M., & Sloane Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. J Biol Chem, 226(1):497-509.

Prieto Guevara, M. J. (2006). Alimento vivo y su importancia en la acuicultura. Revista Electronica de Ingenieria en Produccion Acuicola, Vol. 2 Núm. 2.

UNIVERSIDAD NACIONAL ABIERTA Y A DISTANCIA. (s.f.). unad. Recuperado el 22 de Febrero de 2016, de http://datateca.unad.edu.co/contenidos/301106/EXE_301106/21_estructura_del_tejido_muscular_del_pescado.html.

Elaborado: Qco. Leenin Flores Ramos
Fecha: Julio 2015

Revisado: M.Sc. María Elena Jacinto Tayco
Fecha: Setiembre 2015

Autorizado: Ing. Lili Carrera Santos
Director DGIA
Fecha: Setiembre 2015



PROTOCOLO DE DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS EN EXTRACTOS LIPÍDICOS DE ORGANISMOS ACUÁTICOS

CÓDIGO: DGIA/LB/02.01/AG

Rev. N°.	Fecha	Descripción de la Modificación	Edición	Aprobado por
0	2/09/2015		01	

DISTRIBUIDO A:

DEC	DGIA	AFIA
-----	------	------

Copia No:

ESTA ES UNA COPIA CONTROLADA, SALVO SE INDIQUE DE OTRA MANERA.

Elaborado: Qco. Leenin Flores Ramos Fecha: Julio 2015	Revisado: M.Sc. María Elena Jacinto Tayco Fecha: Setiembre 2015	Autorizado: Ing. Lili Carrera Santos Director DGIA Fecha: Setiembre 2015
---	---	---

	PROTOCOLO -IMARPE-	DGIA / LB/02.01/PR
	PROTOCOLO DE DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS EN EXTRACTOS LIPÍDICOS DE ORGANISMOS ACUÁTICOS	Edición: 01 Revisión: 0 Fecha : 07/09/2015 Página 2 de 6

1. OBJETIVO:

Determinar el contenido de ácidos grasos en extractos lipídicos de organismos acuáticos.

2. ALCANCE:

Esta técnica se aplica a muestras de extractos lipídicos de organismos acuáticos.

3. TÉRMINOS Y DEFINICIONES

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

4. RESPONSABILIDADES

El Responsable o Jefe de Laboratorio:

- 4.1 Es responsable de asegurar el cumplimiento del presente protocolo.
- 4.2 Supervisa que los controles de calidad se realicen.
- 4.3 Supervisa el correcto ingreso de datos de los registros internos de trabajo.
- 4.4 Designa y autoriza al personal capacitado para manejar el equipo.

El Analista:

- 4.5 Aplica el presente protocolo.
- 4.6 Realiza el mantenimiento externo del equipo y sus componentes.
- 4.7 Ingresa los datos en la hoja de cálculo.
- 4.8 Elabora el informe de ensayo.
- 4.8 Llena los registros internos de trabajo.

5. EQUIPOS Y MATERIALES

5.1 EQUIPOS

- Cromatógrafo de gases con detector FID Modelo Varian CP3800
- Termobañó (baño maría) MRC BH-200
- Balanza analítica de 5 decimales Sartorius MSU225S-000-DU
- Campana extractora de gases Labconco
- Baño de ultrasonido Branson 2510
- Vórtex VELP Scientifica Wizard

5.2 MATERIALES

- Micropipeta de rango variable 100-1000 µL.
- Micropipeta de rango variable 10-100 µL.
- Tubos de ensayo de 10 mL con tapa de teflón.
- Viales con tapa de 2 mL.
- Pipetas graduadas de 1 y 5 mL.
- Nitrógeno gas extra puro

Elaborado: Qco. Leenin Flores Ramos Fecha: Julio 2015	Revisado: M.Sc. María Elena Jacinto Tayco Fecha: Setiembre 2015	Autorizado: Ing. Lili Carrera Santos Director DGIA Fecha: Setiembre 2015
---	---	---



PROTOKOLO
-IMARPE-

DGIA / LB/02.01/PR

**PROTOKOLO DE DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS EN
EXTRACTOS LIPÍDICOS DE ORGANISMOS ACUÁTICOS**

Edición: 01
Revisión: 0
Fecha : 07/09/2015
Página 3 de 6

- Helio UHP 5.0
- Aire sintético UHP 5.0
- Hidrógeno UHP 5.

5.3 REACTIVOS

- Tricosanoato de metilo 1mg/mL en cloroformo (Estándar interno): Pese 25 mg de tricosanoato de metilo en una fiola de 25 mL, añada aproximadamente 10 mL de cloroformo y disuelva completamente con la ayuda de un baño de ultrasonido, finalmente enrase con cloroformo.
- Ácido Clorhídrico concentrado P.A.
- Metanol HPLC
- Hexano GC
- Tolueno GC.

6. PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

6.1 ENSAYO DE ÁCIDOS GRASOS, método adaptado de Ichihara y Fukubayashi, 2010

- Añada 100 µL de la solución de estándar interno a un tubo de 10 mL con tapa de teflón, luego adicione 100 µL de la muestra de lípidos (conservada en cloroformo en una concentración de 10 mg/mL), este procedimiento se hace por duplicado.
- Inyecte nitrógeno gas con cuidado al interior del tubo para remover el cloroformo.
- Adicione 0.2 mL de tolueno al tubo con muestra y agite suavemente con el vórtex durante 10 segundos.
- Añada 1.5 mL de metanol y agite suavemente con el vórtex durante 10 segundos.
- Adicione 0.3 mL del catalizador ácido preparado mezclando 1 mL de HCl y 4.3 mL de metanol.
- Remueva el aire del interior del tubo inyectando nitrógeno gas durante 1 min, tape inmediatamente el tubo y se agite vigorosamente con el vórtex por un lapso de 1 min.
- Coloque el tubo en termo-baño a 45 °C por 14 horas.
- Al día siguiente, deje enfriar los tubos a temperatura ambiente.
- Agregue 1.5 mL de hexano al tubo, remueva el aire del interior inyectando nitrógeno gas durante 1 min, tape inmediatamente y agite vigorosamente con el vórtex por un lapso de 1 min.
- Luego añada 1mL de agua ultrapura al tubo, remueva el aire del interior inyectando nitrógeno gas durante 1 min, tape inmediatamente y agite vigorosamente con el vórtex por un lapso de 1 min.
- Centrifugue el tubo a una velocidad de 1500 rpm por 5 min para ayudar a separar las fases.
- Coloque la fase superior de hexano en un vial de 2 mL para ser analizado por cromatografía gaseosa.



PROTOCOLO
-IMARPE-

DGIA / LB/02.01/PR

**PROTOCOLO DE DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS EN
EXTRACTOS LIPÍDICOS DE ORGANISMOS ACUÁTICOS**

Edición: 01
Revisión: 0
Fecha : 07/09/2015
Página 4 de 6

6.2 CONDICIONES DEL EQUIPO DE CROMATOGRAFÍA DE GASES

- Columna capilar de sílice fundida de 30 m x 0.25 mm ID, 0.25 µm.
- Volumen de inyección: 1 µL
- Flujo del gas portador en la columna: 1 mL/min
- Inyección de la muestra: Splitless (0,5 min)
- Temperatura del inyector : 250 °C
- Temperatura del detector : 260 °C
- Horno: 120 °C 1 min, luego de 30 °C/min, hasta 160 °C, 160 °C 1 min, luego 4 °C/min hasta 240 °C, 240 °C 7 min.

6.3 CONTROL DE CALIDAD

El duplicado de la muestra deberá tener una desviación estándar relativa porcentual (RSD%) menor a 10%, en caso contrario se repite la prueba.

7. PROCESAMIENTO DE DATOS Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Para obtener la concentración de los ácidos grasos en la muestra se calcula mediante la fórmula:

$$FA = \frac{C_{is} * A_i}{A_{is}}$$

Dónde:

FA = Concentración del ácido graso i en la muestra (mg)

C_{is} = Peso del estándar interno (µg)

A_i = Área del pico del ácido graso i (µV*min)

A_{is} = Área del pico del estándar interno (µV*min)



PROTOCOLO
-IMARPE-

DGIA / LB/02.01/PR

**PROTOCOLO DE DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS EN
EXTRACTOS LIPÍDICOS DE ORGANISMOS ACUÁTICOS**

Edición: 01
Revisión: 0
Fecha : 07/09/2015
Página 5 de 6

8. FORMATO DE REGISTRO DE DATOS LB / F – CH 02.01

FA	Área Réplica A ($\mu V \cdot \text{min}$)	Área Réplica B ($\mu V \cdot \text{min}$)	%FA	mg FA/g lípidos Réplica A	mg FA/g lípidos Réplica B	mg FA/g muestra seca Réplica A	mg FA/g muestra seca Réplica B	mg FA/g muestra seca Promedio
14:0								
16:0								
16:1n-7								
18:0								
18:1n-9								
18:1n-7								
18:2n-6								
18:3n-6								
18:3n-3								
18:4n-3								
20:4n-6 (AA)								
20:4n-3								
20:5n-3 (EPA)								
1*								
22:5n-3								
22:6n-3 (DHA)								
23:0 (I.S)								

9. BIBLIOGRAFIA

Ichihara, K., & Fukubayashi, Y. (2010). Preparation of fatty acid methyl esters for gas-liquid chromatography. J Lipid Res, 51(3): 635–640.

Elaborado: Qco. Leenin Flores Ramos
Fecha: Julio 2015

Revisado: M.Sc. María Elena Jacinto Tayco
Fecha: Setiembre 2015

Autorizado: Ing. Lili Carrera Santos
Director DGIA
Fecha: Setiembre 2015



PROTOCOLO
-IMARPE-

DGIA / LB/02.01/PR

**PROTOCOLO DE DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS EN
EXTRACTOS LIPÍDICOS DE ORGANISMOS ACUÁTICOS**

Edición: 01
Revisión: 0
Fecha : 07/09/2015
Página 6 de 6

Elaborado: Qco. Leenin Flores Ramos
Fecha: Julio 2015

Revisado: M.Sc. María Elena Jacinto Tayco
Fecha: Setiembre 2015

Autorizado: Ing. Lili Carrera Santos
Director DGIA
Fecha: Setiembre 2015



PROTOCOLO DE DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS EN CULTIVO DE MICROALGAS

CÓDIGO: DGIA/LB/02.01/AG

Rev. N°.	Fecha	Descripción de la Modificación	Edición	Aprobado por
0	2/09/2015		01	

DISTRIBUIDO A:

DEC		DGIA		AFIA	
-----	--	------	--	------	--

Copia No:

ESTA ES UNA COPIA CONTROLADA, SALVO SE INDIQUE DE OTRA MANERA.

Elaborado: Qco. Leenin Flores Ramos Fecha: Julio 2015	Revisado: M.Sc. María Elena Jacinto Tayco Fecha: Setiembre 2015	Autorizado: Ing. Lili Carrera Santos Director DGIA Fecha: Setiembre 2015
---	---	---



PROTOCOLO
-IMARPE-

DGIA / LB/02.01/PR

PROTOCOLO DE DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS EN CULTIVO DE MICROALGAS

Edición: 01
Revisión: 0
Fecha : 07/09/2015
Página 2 de 6

1. OBJETIVO:

Determinar el contenido de ácidos grasos en cultivo de microalgas mediante cromatografía gaseosa.

2. ALCANCE:

Esta técnica se aplica a muestras de cultivos de microalgas marinas y continentales.

3. TÉRMINOS Y DEFINICIONES

Microalgas: microorganismos fotosintéticos del orden de las micras en unidad de medidas, pueden ser unicelulares, filamentosas ó coloniales, presentan como estructura externa membrana y/o pared celular ó exoesqueleto de sílice, son, además, capaces de transformar el CO₂ en biomasa orgánica.

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

4. RESPONSABILIDADES

El Responsable o Jefe de Laboratorio:

- 4.1 Es responsable de asegurar el cumplimiento del presente protocolo.
- 4.2 Supervisa que los controles de calidad se realicen.
- 4.3 Supervisa el correcto ingreso de datos de los registros internos de trabajo.
- 4.4 Designa y autoriza al personal capacitado para manejar el equipo.

El Analista:

- 4.5 Aplica el presente protocolo.
- 4.6 Realiza el mantenimiento externo del equipo y sus componentes.
- 4.7 Ingresa los datos en la hoja de cálculo.
- 4.8 Elabora el informe de ensayo.
- 4.8 Llena los registros internos de trabajo.

5. EQUIPOS Y MATERIALES

5.1 EQUIPOS

- Cromatógrafo de gases con detector FID Modelo Varian CP3800
- Centrifuga refrigerada Eppendorf Centrifuge 5702R
- Termo-baño (baño maría) MRC BH-200
- Campana extractora de gases Labconco
- Baño de ultrasonido Branson 2510
- Vórtex VELP Scientifica Wizard

5.2 MATERIALES

- Micropipeta de rango variable 100-1000 µL.
- Micropipeta de rango variable 10-100 µL.

Elaborado: Qco. Leenin Flores Ramos
Fecha: Julio 2015

Revisado: M.Sc. María Elena Jacinto Tayco
Fecha: Setiembre 2015

Autorizado: Ing. Lili Carrera Santos
Director DGIA
Fecha: Setiembre 2015

	PROTOCOLO -IMARPE-	DGIA / LB/02.01/PR
	PROTOCOLO DE DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS EN CULTIVO DE MICROALGAS	Edición: 01 Revisión: 0 Fecha : 07/09/2015 Página 3 de 6

- Tubos de ensayo de 10 mL con tapa de teflón.
- Viales con tapa de 2 mL.
- Pipetas graduadas de 1 y 5 mL.
- Nitrógeno gas extra puro
- Helio UHP 5.0
- Aire sintético UHP 5.0
- Hidrógeno UHP 5.0.

5.3 REACTIVOS

- Metanol grado HPLC.
- Trifluoruro de boro 14 % en metanol, se mezcla 7 mL de trifluoruro de boro 20 % y 3 mL de metanol.
- Tolueno P.A.
- 2,2 dimetoxipropano P.A.
- Metóxido de sodio 0.5 N en metanol. Se disuelve 0.2 g de hidróxido de sodio en 10 mL de metanol.
- Tricosanoato de metilo 1mg/mL en cloroformo (Estándar interno): Pese 25 mg de tricosanoato de metilo en una fiola de 25 mL, añada aproximadamente 10 mL de cloroformo y disuelva completamente con la ayuda de un baño de ultrasonido, finalmente enrase con cloroformo.
- Hexano GC.

6. PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

6.1 ENSAYO DE ÁCIDOS GRASOS, método adaptado de Griffiths 2010

- Coloque un volumen (de 5 ó 10 mL) de cultivo de microalgas en un tubo de ensayo de 10 mL con tapa por duplicado.
- Centrifugue a 4000 rpm por 20 min a 4 °C.
- Retire el sobrenadante con una pipeta pasteur y prepare un blanco que consta de 80 µL de agua ultrapura.
- Adicione 20 µL de estándar interno, 0.5 mL de tolueno, 0.1 mL de 2.2 dimetoxipropano y 1 mL de metóxido de sodio 0.5 N a cada tubo incluyendo el blanco.
- Desplace el aire del interior del tubo inyectando nitrógeno gas por 1 min, tape el tubo y homogenice en baño de ultrasonido por 5 min.
- Coloque los tubos en termo-baño a 80 °C por 20 min y deje enfriar a temperatura ambiente.
- Añada 1.5 mL de trifluoruro de boro 14%, desplace el aire del interior del tubo inyectando nitrógeno gas por 1 min y coloque los tubos en termo-baño a 80 °C por 20 min.
- Deje enfriar a temperatura ambiente, agregue 1.5 mL de hexano, desplace el aire del interior del tubo inyectando nitrógeno gas por 1 min y homogenice con el vórtex por 1 min.

Elaborado: Qco. Leenin Flores Ramos Fecha: Julio 2015	Revisado: M.Sc. María Elena Jacinto Tayco Fecha: Setiembre 2015	Autorizado: Ing. Lili Carrera Santos Director DGIA Fecha: Setiembre 2015
---	---	---



PROTOCOLO
-IMARPE-

DGIA / LB/02.01/PR

PROTOCOLO DE DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS EN CULTIVO DE MICROALGAS

Edición: 01
Revisión: 0
Fecha : 07/09/2015
Página 4 de 6

- Agregue 1 mL de agua ultrapura, desplace el aire del interior del tubo inyectando nitrógeno gas por 1 min y homogenice con el vórtex por 1 min.
- Coloque la fase superior de hexano en un vial de 2 mL para ser analizado por cromatografía gaseosa.

6.2 CONDICIONES DEL EQUIPO DE CROMATOGRAFÍA DE GASES

- Columna capilar de sílice fundida de 30 m x 0.25 mm ID, 0.25 μ m.
- Volumen de inyección: 1 μ L
- Flujo del gas portador en la columna: 1 mL/min
- Inyección de la muestra: Splitless (0.5 min)
- Temperatura del inyector : 250 $^{\circ}$ C
- Temperatura del detector : 260 $^{\circ}$ C
- Horno: 120 $^{\circ}$ C 1 min, luego de 30 $^{\circ}$ C/min, hasta 160 $^{\circ}$ C, 160 $^{\circ}$ C 1 min, luego 4 $^{\circ}$ C/min hasta 240 $^{\circ}$ C, 240 $^{\circ}$ C 7 min
- Horno: 120 $^{\circ}$ C 1 min, luego de 30 $^{\circ}$ C/min, hasta 160 $^{\circ}$ C, 160 $^{\circ}$ C 1 min, luego 4 $^{\circ}$ C/min hasta 240 $^{\circ}$ C, 240 $^{\circ}$ C 7 min.

6.3 CONTROL DE CALIDAD

El duplicado de la muestra deberá tener una desviación estándar relativa porcentual (RSD%) menor a 10%, en caso contrario se repite la prueba.

7. PROCESAMIENTO DE DATOS Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Para obtener la concentración de los ácidos grasos en la muestra se calcula mediante la fórmula:

$$FA = \frac{C_{is} * A_i}{A_{is} * V}$$

Dónde:

FA = Concentración del ácido graso i en la muestra (mg)

C_{is} = Peso del estándar interno (μ g)

A_i = Área del pico del ácido graso i (μ V*min)

A_{is} = Área del pico del estándar interno (μ V*min)

V = Volumen de la muestra (mL)



PROCOLO
-IMARPE-

DGIA / LB/02.01/PR

**PROCOLO DE DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS EN
CULTIVO DE MICROALGAS**

Edición: 01
Revisión: 0
Fecha : 07/09/2015
Página 5 de 6

8. FORMATO DE REGISTRO DE DATOS LB / F – AG 02.01

FA	Área Réplica A ($\mu\text{V} \cdot \text{min}$)	Área Réplica B ($\mu\text{V} \cdot \text{min}$)	%FA	mg FA/g lípidos Réplica A	mg FA/g lípidos Réplica B	mg FA/g muestra seca Réplica A	mg FA/g muestra seca Réplica B	mg FA/g muestra seca Promedio
14:0								
16:0								
16:1n-7								
18:0								
18:1n-9								
18:1n-7								
18:2n-6								
18:3n-6								
18:3n-3								
18:4n-3								
20:4n-6 (AA)								
20:4n-3								
20:5n-3 (EPA)								
1*								
22:5n-3								
22:6n-3 (DHA)								
23:0 (I.S)								

9. BIBLIOGRAFIA

Griffiths, M. J., van Hille, R. P., & Harrison, S. T. (2010). Selection of direct transesterification as the preferred method for assay of fatty acid content of microalgae. *Epub*, 45(11):1053-60.

Elaborado: Qco. Leenin Flores Ramos
Fecha: Julio 2015

Revisado: M.Sc. María Elena Jacinto Tayco
Fecha: Setiembre 2015

Autorizado: Ing. Lili Carrera Santos
Director DGIA
Fecha: Setiembre 2015



PROTOCOLO
-IMARPE-

DGIA / LB/02.01/PR

**PROTOCOLO DE DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS EN
CULTIVO DE MICROALGAS**

Edición: 01
Revisión: 0
Fecha : 07/09/2015
Página 6 de 6

Elaborado: Qco. Leenin Flores Ramos
Fecha: Julio 2015

Revisado: M.Sc. María Elena Jacinto Tayco
Fecha: Setiembre 2015

Autorizado: Ing. Lili Carrera Santos
Director DGIA
Fecha: Setiembre 2015



PROTOCOLO DE DETERMINACIÓN DE HUMEDAD EN BIOMASA DE ORGANISMOS ACUÁTICOS

CÓDIGO: DGIA/L BA/P-01.01/HU

Rev. N°.	Fecha	Descripción de la Modificación	Edición	Aprobado por
0	2/09/2015		01	

DISTRIBUIDO A:

DEC		DGIA		AFIA	
-----	--	------	--	------	--

Copia No:

ESTA ES UNA COPIA CONTROLADA, SALVO SE INDIQUE DE OTRA MANERA.

Elaborado: Qco. Leenin Flores Ramos Fecha: Julio 2015	Revisado: M.Sc. María Elena Jacinto Tayco Fecha: Setiembre 2015	Autorizado: Ing. Lili Carrera Santos Director DGIA Fecha: Setiembre 2015
---	---	---



PROTOCOLO
-IMARPE-

DGIA / LB/02.01/PR

**PROTOCOLO DE DETERMINACIÓN DE HUMEDAD EN
BIOMASA DE ORGANISMOS ACUÁTICOS**

Edición: 01
Revisión: 0
Fecha : 07/09/2015
Página 2 de 4

1. OBJETIVO:

El presente protocolo establece las pautas a seguir para la determinación del porcentaje de humedad en organismos acuáticos.

2. ALCANCE:

La técnica se aplica en muestras de organismos acuáticos.

3. TÉRMINOS Y DEFINICIONES

Microalgas: microorganismos fotosintéticos del orden de las micras en unidad de medidas, pueden ser unicelulares, filamentosas ó coloniales, presentan como estructura externa membrana y/o pared celular ó exoesqueleto de sílice, son, además, capaces de transformar el CO₂ en biomasa orgánica.

Liofilización: Es un proceso en el que se congela el producto y posteriormente se introduce en una cámara de vacío para realizar la separación del agua por sublimación. De esta manera se elimina el agua desde el estado sólido al gaseoso del ambiente sin pasar por el estado líquido. Para acelerar el proceso se utilizan ciclos de congelación-sublimación con los que se consigue eliminar prácticamente la totalidad del agua libre contenida en el producto original, preservando la estructura molecular de la sustancia liofilizada.

Tejido de pez: La musculatura del pescado está constituida por un sistema que va a lo largo en forma paralela, de todo el cuerpo, el cual se halla dividido en dirección dorsoventral por las apófisis vertebrales y radios de las aletas y en sentido horizontal por las paredes divisiones o septas (tabiques de tejido conectivo o miocomata).

Alimento vivo: Describe el grupo de organismos planctónicos que constituyen la base en la alimentación de los estadios larvarios de los crustáceos, las postlarvas de peces y las diferentes fases en el desarrollo de los moluscos. Entre el zooplancton se destacan organismos tales como las artemias y los rotíferos

4. RESPONSABILIDADES

El Responsable o Jefe de Laboratorio:

- 4.1 Es responsable de asegurar el cumplimiento del presente protocolo.
- 4.2 Supervisa que los controles de calidad se realicen.
- 4.3 Supervisa el correcto ingreso de datos de los registros internos de trabajo.
- 4.4 Designa y autoriza al personal capacitado para manejar el equipo.

El Analista:

- 4.5 Aplica el presente protocolo.
- 4.6 Realiza el mantenimiento externo del equipo y sus componentes.
- 4.7 Ingresar los datos en la hoja de cálculo.
- 4.8 Elabora el informe de ensayo.
- 4.8 Llena los registros internos de trabajo.

5. EQUIPOS Y MATERIALES

5.1 EQUIPOS

- Balanza analítica de 220 g de 5 decimales Sartorius MSU225S-000-DU
- Estufa de vacío MMM Vacucell 55

Elaborado: Qco. Leenin Flores Ramos
Fecha: Julio 2015

Revisado: M.Sc. María Elena Jacinto Tayco
Fecha: Setiembre 2015

Autorizado: Ing. Lili Carrera Santos
Director DGIA
Fecha: Setiembre 2015



PROCOLO
-IMARPE-

DGIA / LB/02.01/PR

**PROCOLO DE DETERMINACIÓN DE HUMEDAD EN
BIOMASA DE ORGANISMOS ACUÁTICOS**

Edición: 01
Revisión: 0
Fecha : 07/09/2015
Página 3 de 4

5.2 MATERIALES

- Placa de Petri de vidrio 60 x 15 mm
- Desecador.

6. PROCEDIMIENTO

- Efectúe el análisis por duplicado.
- Coloque la placa de Petri durante 1 hora en la estufa de vacío a una temperatura de 105 °C.
- Retire la placa de Petri, trasládelo a un desecador y deje enfriar durante 30 a 45 min.
- Pese la placa de Petri destapada y registre su peso (m_1).
- Pese la muestra de acuerdo a la Tabla 1 y registre su peso (m_2)
- Coloque la placa de Petri semi-destapada con muestra en la estufa de vacío a las condiciones que se describen en la Tabla 1.

Tabla 1. Condiciones de la prueba de Humedad

Muestra	Masa (g)	Tiempo (h)	Temperatura (°C)	Presión (bar)
Microalga liofilizada	0.10000	2	105	<0.01
Tejido de peces	0.25000	16	105	<0.01
Ovocitos y larvas de peces	0.50000	16	105	<0.01
Gónadas de erizo	0.50000	16	105	<0.01
Alimento vivo (Rotíferos y artemias)	0.25000	16	105	<0.01

- Trasládelo a un desecador y deje enfriar durante 30 a 45 min.
- Pese la placa de Petri destapada con muestra y registre su peso (m_3).

7. CONTROL DE CALIDAD

El duplicado de la muestra deberá tener una desviación estándar relativa porcentual (RSD%) menor a 4%, en caso contrario se repite la prueba.

8. PROCESAMIENTO DE DATOS Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Para obtener el porcentaje de humedad de la biomasa seca, emplee la siguiente fórmula:

$$\%H = \left(\frac{m_2 - (m_3 - m_1)}{m_2} \right) * 100\%$$

Dónde:

m_1 = Peso de la placa de Petri vacía sin tapa (g).

m_2 = Peso de la biomasa seca (g)

m_3 = Peso de la placa de Petri sin tapa conteniendo la biomasa seca (g).

	PROTOCOLO -IMARPE-	DGIA / LB/02.01/PR
	PROTOCOLO DE DETERMINACIÓN DE HUMEDAD EN BIOMASA DE ORGANISMOS ACUÁTICOS	Edición: 01 Revisión: 0 Fecha : 07/09/2015 Página 4 de 4

9. FORMATO DE REGISTRO DE DATOS PARA LA DETERMINACIÓN DE HUMEDAD

Réplica	W placa (g)	W muestra (g)	W placa+muestra seca (g)	W humedad (g)	%Humedad (w/w)
1					
2					
				Promedio	
				Des.Est	

10. BIBLIOGRAFIA

AOAC. (1980). Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemist. Washington: AOAC.

Arredondo, B. O., & Voltolina, D. (2007). Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal. México: Centro de Investigaciones Biológicas del Noereste.

Elaborado: Qco. Leenin Flores Ramos Fecha: Julio 2015	Revisado: M.Sc. María Elena Jacinto Tayco Fecha: Setiembre 2015	Autorizado: Ing. Lili Carrera Santos Director DGIA Fecha: Setiembre 2015
---	---	---



PROTOCOLO DE DETERMINACIÓN DE CENIZAS EN BIOMASA DE MICROALGAS LIOFILIZADAS

CÓDIGO: DGIA/L BA/P-01.01/CZ

Rev. N°.	Fecha	Descripción de la Modificación	Edición	Aprobado por
0	2/09/2015		01	

DISTRIBUIDO A:

DEC	DGIA	AFIA
-----	------	------

Copia No:

ESTA ES UNA COPIA CONTROLADA, SALVO SE INDIQUE DE OTRA MANERA.

Elaborado: Qco. Leenin Flores Ramos Fecha: Julio 2015	Revisado: M.Sc. María Elena Jacinto Tayco Fecha: Setiembre 2015	Autorizado: Ing. Lili Carrera Santos Director DGIA Fecha: Setiembre 2015
---	---	---

	PROTOCOLO -IMARPE-	DGIA / LB/02.01/PR
	PROTOCOLO DE DETERMINACIÓN DE CENIZAS EN BIOMASA DE MICROALGAS LIOFILIZADAS	Edición: 01 Revisión: 0 Fecha : 07/09/2015 Página 2 de 4

1. OBJETIVO:

Determinar el porcentaje de cenizas en biomasa de microalgas liofilizadas.

2. ALCANCE:

La técnica se aplica en muestras de microalgas marinas y continentales previamente liofilizadas.

3. TÉRMINOS Y DEFINICIONES

Microalgas: Microorganismos fotosintéticos del orden de las micras en unidad de medidas, pueden ser unicelulares, filamentosas ó coloniales, presentan como estructura externa membrana y/o pared celular ó exoesqueleto de sílice, son, además, capaces de transformar el CO₂ en biomasa orgánica.

Liofilización: Es un proceso en el que se congela el producto y posteriormente se introduce en una cámara de vacío para realizar la separación del agua por sublimación. De esta manera se elimina el agua desde el estado sólido al gaseoso del ambiente sin pasar por el estado líquido. Para acelerar el proceso se utilizan ciclos de congelación-sublimación con los que se consigue eliminar prácticamente la totalidad del agua libre contenida en el producto original, preservando la estructura molecular de la sustancia liofilizada.

4. RESPONSABILIDADES

El Responsable o Jefe de Laboratorio:

- 4.1 Es responsable de asegurar el cumplimiento del presente protocolo.
- 4.2 Supervisa que los controles de calidad se realicen.
- 4.3 Supervisa el correcto ingreso de datos de los registros internos de trabajo.
- 4.4 Designa y autoriza al personal capacitado para manejar el equipo.

El Analista:

- 4.5 Aplica el presente protocolo.
- 4.6 Realiza el mantenimiento externo del equipo y sus componentes.
- 4.7 Ingresa los datos en la hoja de cálculo.
- 4.8 Elabora el informe de ensayo.
- 4.8 Llena los registros internos de trabajo.

5. EQUIPOS Y MATERIALES

5.1 EQUIPOS

- Balanza analítica de 220 g de 5 decimales Sartorius MSU225S-000-DU
- Mufla Thermolyne F6010

5.2 MATERIALES

- Crisol de porcelana de 10 mL
- Desecador.

6. PROCEDIMIENTO

- Efectúe el análisis por duplicado.
- Coloque el crisol durante 1 hora en la mufla a una temperatura de 550 °C.

Elaborado: Qco. Leenin Flores Ramos Fecha: Julio 2015	Revisado: M.Sc. María Elena Jacinto Tayco Fecha: Setiembre 2015	Autorizado: Ing. Lili Carrera Santos Director DGIA Fecha: Setiembre 2015
---	---	---



PROCOLO
-IMARPE-

DGIA / LB/02.01/PR

**PROCOLO DE DETERMINACIÓN DE CENIZAS EN
BIOMASA DE MICROALGAS LIOFILIZADAS**

Edición: 01
Revisión: 0
Fecha : 07/09/2015
Página 3 de 4

- Retire el crisol, trasládalo a un desecador y deje enfriar durante 30 a 45 min.
- Pese el crisol y registre su peso (m_1).
- Pese 0.10000 g de biomasa liofilizada y registre su peso (m_2).
- Coloque el crisol con la muestra en la mufla a una temperatura de 550 °C durante 3 horas.
- Trasládalo a un desecador y deje enfriar durante 30 a 45 min.
- Pese el crisol con la muestra calcinada y registre su peso (m_3).

7. CONTROL DE CALIDAD

El duplicado de la muestra deberá tener una desviación estándar relativa porcentual (RSD%) menor a 1.5%, en caso contrario se repite la prueba.

8. PROCESAMIENTO DE DATOS Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Para obtener el porcentaje de cenizas de la biomasa seca, emplee la siguiente fórmula:

$$\%C = \left(\frac{m_3 - m_1}{m_2} \right) * 100\%$$

Dónde:

m_1 = Peso del crisol vacío (g).

m_2 = Peso de la biomasa seca (g)

m_3 = Peso del crisol conteniendo la biomasa calcinada (g).

9. FORMATO DE REGISTRO DE DATOS PARA LA DETERMINACIÓN DE CENIZAS

Réplica	W crisol (g)	W muestra (g)	W crisol+cenizas (g)	W cenizas (g)	%cenizas (w/w)
1					
2					
				Promedio	
				Des.Est	

10. BIBLIOGRAFIA

AOAC. (1980). Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemist. Washington: AOAC.

Arredondo, B. O., & Voltolina, D. (2007). Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal. México: Centro de Investigaciones Biológicas del Noereste.



PROCOLO
-IMARPE-

DGIA / LB/02.01/PR

PROCOLO DE DETERMINACIÓN DE CENIZAS EN
BIOMASA DE MICROALGAS LIOFILIZADAS

Edición: 01
Revisión: 0
Fecha : 07/09/2015
Página 4 de 4

Elaborado: Qco. Leenin Flores Ramos
Fecha: Julio 2015

Revisado: M.Sc. María Elena Jacinto Tayco
Fecha: Setiembre 2015

Autorizado: Ing. Lili Carrera Santos
Director DGIA
Fecha: Setiembre 2015