



Universidad de Chile.
Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias.
Dpto. Fomento de la Producción Animal.
Unidad 26

Chemical evaluation of lipids in food

Current methods, characteristics and foundations

Evaluación química de los lípidos en los alimentos

Métodos actuales, características y fundamentos

Luis, Bravo T; Sebastián, Cabrera F; Leandro, Cádiz N; Camila, Cajas D.

Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.

Abstract

In the present work we seek to announce the most important methods for the chemical evaluation of the lipids in the food. We consider the method (1) Soxhlet and (2) Supercritical fluid extraction (SFE) for the extraction of total lipids using different solvents;(3) Chromatographies that give qualitative and quantitative result of the sample, inside this article we describe 4 types: a) High Performance Liquid Chromatography (HPLC): being most used for lipids, phase reverse: this technical bases on the interactions of the polar solvent, not polar simple for analysis and stationary not polar phase; b) Thin Layer Chromatography (TLC): there uses a thin cap of particles finely divided as stationary phase, the sample and solvent that they move for capillarity; c) Gas chromatography: the mobile phase is an inert gas, the stationary phase changes according to the type of chromatography, existing of gas-liquid and of gas-solid; d) Adsorption chromatography: it is based on the degree of adhesion of the components on the stationary phase and on the different solubility of the substances to the combination of solvents, which makes pass for the mobile phase; (4) Near Infrared (NIR): it is a type of spectroscopy, which aim is generate mathematical models who relate chemical composition to changes of energy in region corresponding to the near infrared range; finally (5) Mass spectrometry (MS): uses ions movement in electrical and magnetic fields to classify them according to the mass- load relation.

Key words: methods, quantitative, qualitative, chromatography, extraction, lipids, mobile phase and stationary phase.

Palabras clave: métodos, cuantitativo, cualitativo, cromatografía, extracción, lípidos, fase móvil y fase estacionaria.

Introducción

Evaluar químicamente los lípidos en los alimentos es muy importante para la nutrición, tanto animal como humana, ya que es necesario para medir la calidad nutricional de los alimentos, además, para formular buenas dietas de acuerdo a los requerimientos o propósitos de la especie animal si hablamos de sistemas productivos.

En este trabajo se busca dar a conocer los métodos más utilizados para la extracción y cuantificación de lípidos, ya sea usando solventes o con métodos instrumentales. Estos métodos son: Soxhlet, SFE, HPLC, TLC, GC, cromatografía de adsorción, NIR y MS.

1. Métodos con solventes

1.1. Soxhlet

Se utiliza para cuantificar el total de lípidos de la muestra.

El equipo soxhlet realiza extracciones continuas automáticamente, con un solvente que se va evaporando, condensando y volviendo a utilizar hasta que el contenido a analizar esté lo más puro posible (Nuñez, 2008).

Una parte de la muestra es colocada en un cartucho (en general de porcelana porosa), para evitar que la muestra flote y salga del recipiente se pone un tapón de algodón. Posteriormente se agrega el solvente, asegurándose que la cantidad sea adecuada. Los solventes pueden ser: éter, cloroformo, acetona, éter de petróleo, entre otros.

Al terminar el tiempo de estudio, conviene esperar para que el equipo se enfríe y sea más fácil de manipular; finalmente se saca la muestra y se deja secar (Nuñez, 2008).

Esta técnica requiere mucho tiempo, pero su principal inconveniente es que las extracciones de lípidos son incompletas para muchos alimentos, en especial para los productos cocidos al horno o los que contienen gran cantidad de grasas estructurales.

Los resultados obtenidos se expresan de la siguiente manera:

$$\text{ppm (G y A)} = \frac{(P_2 - P_1) * 10^6}{V_1}$$

ppm (G y A): Concentración de Grasa y Aceites en ppm (mg/L)

P₁: Peso del matraz (libre de humedad) antes de la extracción

P₂: Peso el matraz después de la extracción y el secado

V₁: Volumen de la muestra filtrada

10⁶: Factor de conversión

1.2. SFE (*Supercritical Fluid Extraction*)

Este método no usa solventes orgánicos que son dañinos por su activo rol en el calentamiento global, en cambio utiliza el dióxido de carbono (CO₂) a alta presión.

Un fluido supercrítico es una sustancia que se encuentra a una presión y temperatura mayor a su punto crítico, es un cuasi estado con propiedades intermedias entre líquido y gas (Ruffino y Napolitano, 2007). Este agente extractor tiene ventajas, entre las que mencionamos: alta capacidad de disolvente, no tóxico, gas en condiciones ambientales, haciendo que la eliminación del solvente sea inmediata y no genere residuos.

Existen compañías como *ISCO Inc* y *LECO Corporation* que ya han fabricado los sofisticados equipos para la venta.

1.3. Cromatografías

1.3.1. HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*)

Se constituye de dos fases una estacionaria activa y otra móvil líquida interactiva. La separación de las muestras se basa en la interacción del analito con ambas fases. La HPLC ofrece una mayor variedad de fases estacionarias, permitiendo una mayor gama de interacciones selectivas y más posibilidades para la separación, la cual se realiza en forma sencilla, colocando un recipiente abierto al final de la columna (Romero, 2002).

Existen varios tipos. Sin embargo la de fase inversa es la utilizada para lípidos.

C. de fase inversa: La fase estacionaria es no polar y la fase móvil es moderadamente polar. Al agregarle disolventes polares a la fase estacionaria aumenta el tiempo de retención; lo contrario ocurre si adicionamos disolventes hidrofóbicos. Esta técnica se basa en las interacciones del disolvente polar, analito no polar y fase estacionaria.

Si el analito es muy grande puede causar que la interacción no sea completa. El tiempo de retención aumenta conforme al área de hidrofobicidad, que es inversamente proporcional al tamaño del soluto (Skoog, *et al.*, 2005).

El pH modifica la hidrofobia del analito, por esto, se utilizan buffer (fosfato sódico) o ácidos como el ácido fórmico o ácido trifluoracético que sirven para controlar el pH, neutralizar cargas residuales del silicato de la fase estacionaria, formar pares iónicos para neutralizar la carga del analito (Skoog, *et al.*, 2005).

1.3.2. TLC (*Thin Layer Chromatography*)

La cromatografía en capa fina nos permite conocer mejor cualitativamente la composición lipídica de los alimentos.

Se utiliza una capa plana y delgada que actúa de soporte, en general se utiliza gel de sílice (*silica gel*) (Newton y Schiferl, 1998), que es un polímero de ácido silícico, la presencia de grupos hidroxilo libres hace que este material sea polar. La fase móvil se mueve por capilaridad a través de la fase estacionaria (gravedad o potencial eléctrico). Las separaciones en capa fina se realizan en placas de vidrio o plástico, las que son recubiertas con una capa delgada de partículas finamente divididas: fase estacionaria.

Se aplican disoluciones de la muestra del 0,001 al 0,1% con una mancha de 1 a 2 cm del extremo de la placa. Una vez evaporada la disolución, la placa es colocada en un recipiente cerrado y saturado con los vapores del disolvente. Uno de los extremos de la placa se pone en el eluyente, el que asciende por la placa arrastrando la muestra que se mezcla con el diluyente y la fase estacionaria; luego la placa es secada (Christie y Dobson, 1999).

Para determinar las distintas posiciones de los elementos separados se utilizan los siguientes métodos: nebulizar con disoluciones de yodo o de ácido sulfúrico reactivos (ninhidrina) o se agregan materiales fluorescentes a la fase estacionaria para posteriormente visualizar los resultados bajo radiación ultravioleta.

Luego de ubicar los patrones es necesario calcular el valor R_f (factor de retención), que es la distancia que recorrió cada disolución o muestra. Se mide la distancia desde el origen hasta la mancha (X) y desde el origen hasta el frente del disolvente (C) y se dividen. ($R_f = X/C$) (Newton y Schiferl, 1998).

1.3.3. Cromatografía de gases

Proporciona información cualitativa y cuantitativa de casi todo tipo de compuestos, siempre y cuando tengan diferencias de volatilidad. Puede ser utilizada para la

caracterización de aceites esenciales, detectando sustancias terpénicas responsables de las propiedades aromáticas en los alimentos. La fase móvil es un gas inerte que arrastrará los compuestos inyectados a una velocidad de migración que dependerá de la naturaleza de éstos, de la naturaleza y velocidad de la fase móvil, de la naturaleza de la fase estacionaria y de la temperatura.

Antes de tomar la muestra, mezclar completamente. Fundir las muestras sólidas para asegurar una buena homogeneización, a no más de 60 °C.

El resultado será un cromatograma donde quedará reflejado el tiempo que ha tardado cada compuesto en salir o tiempo de retención bruto.

Se conocen dos tipos de GC, se diferencian en la naturaleza de la fase móvil:

a) Cromatografía gas-líquido: La fase móvil es un gas y la fase estacionaria un líquido con alto punto de ebullición (para que no se volatilice), de naturaleza inerte y que proporciona películas uniformes. La naturaleza de la fase estacionaria determinará el orden de salida de los compuestos, siendo los compuestos pequeños los primeros en salir. El parámetro utilizado en este caso es el coeficiente de reparto (K).

b) Cromatografía de gas-sólido: La fase móvil es un gas y la fase estacionaria es un sólido poroso, el cual puede ser grafito, gel de sílice o alúmina. La retención de los analitos se debe al equilibrio proporcionado por la adsorción y desorción sobre la superficie del sólido. El parámetro implicado es el coeficiente de adsorción.

El equipo utilizado se denomina cromatógrafo de gases y consta de 4 componentes:

(1) Inyector: entrada de la muestra. (2) Cámara calentada: de fácil acceso para instalar la columna. (3) Detectores: hay universales (sensibles a casi todos los compuestos fluidos) y específicos (sensibles a un tipo particular de molécula). (4) Columnas: existen dos tipos: las empaquetadas y las capilares. Además de estos componentes existe el gas portador que constituye la fase móvil, este suele ser Helio, Nitrógeno o Hidrógeno. En general esta cromatografía se utiliza para la separación de especies gaseosas de bajo peso molecular.

1.3.4. Cromatografía de adsorción

Se basa en el diferente grado de adhesión de los componentes en la fase estacionaria (soporte sólido) y en la distinta solubilidad de las sustancias a la combinación de solventes de diferente polaridad, la que se hace pasar por la fase móvil (soporte sólido).

Es primordial que el soporte sólido sea lo suficientemente fuerte para retener una gran cantidad de las sustancias; se utiliza el gel de sílica como soporte para los lípidos. El grado de adsorción es variable, por ejemplo: los fosfolípidos con un grupo muy polar serán más retenidos que el colesterol libre con un grupo menos polar y este a la vez, más retenido que un triglicérido. De esta manera los fosfolípidos y el colesterol migran más lento que los triglicéridos. Para la identificación de los lípidos se utiliza la determinación de la constante R_f (Fuentes y Campos, 2006).

2. Métodos instrumentales

2.1. NIR (*Near Infrared*)

Algunas clases de lípidos muestran bandas fuertes de absorción de grupos carbonilo en la región infrarroja, por lo que es un tipo de espectroscopia. La utilización efectiva de este método depende de una adecuada y amplia calibración frente a matrices comparables.

Como complemento a las técnicas tradicionales surge el uso de la reflectancia en el infrarrojo cercano, que consiste en irradiar con un haz de luz monocromática los materiales orgánicos, que en función de la naturaleza de los enlaces y cargas electrostáticas existentes entre sus átomos y moléculas, absorben una determinada cantidad de energía (reflectancia). El objetivo de esta técnica es generar modelos matemáticos que relacionen la composición química con cambios de energía en la región correspondiente al rango infrarrojo cercano.

Este método provee información de valores nutricionales de alimentos en segundos, no es destructivo, requiere un mínimo o nulo tratamiento de la muestra, minimiza el daño ambiental y es una técnica multianalítica de alta precisión que permite predecir varios factores simultáneamente. Una vez calibrado el espectrofotómetro, el uso del NIR es de bajos costos. El NIR está establecido para medir la composición lipídica en cereales como granos de maíz. (Vásquez *et al.*, 2004).

2.2. Espectrometría de masas (MS)

Utiliza el movimiento de iones en campos eléctricos y magnéticos para clasificarlos de acuerdo a su relación masa-carga. Es una técnica analítica por medio de la cual las sustancias químicas analizadas (lípidos) se identifican separando los iones gaseosos

en campos eléctricos y magnéticos. Cabe destacar que la MS brinda información cualitativa y cuantitativa acerca de la composición de los materiales.

La parte más importante del espectrómetro es el analizador de masas, que separa los iones que se producen en la fuente de acuerdo a las relaciones de masa-carga.

Resumen

En el presente trabajo buscamos dar a conocer los más importantes métodos para la evaluación química de los lípidos en los alimentos. Consideramos el método (1) Soxhlet y (2) Extracción con fluidos súper críticos (SFE) para la extracción de lípidos totales utilizando diferentes disolventes; (3) Cromatografías que dan tanto un resultado cualitativo, como cuantitativo de la muestra, dentro de este ítem describimos 4 tipos: a) Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC): siendo la más usada para lípidos, la de fase reversa, ésta técnica se basa en las interacciones del disolvente polar, analito no polar y fase estacionaria no polar; b) Cromatografía en capa fina (TLC): utiliza una capa delgada de partículas finamente divididas como fase estacionaria, la muestra y un disolvente que se mueven por capilaridad; c) Cromatografía de gases: la fase móvil es un gas inerte, la fase estacionaria varía según el tipo de cromatografía, existiendo de gas- líquido y de gas- sólido; d) Cromatografía de adsorción: se basa en el grado de adhesión de los componentes en la fase estacionaria y en la distinta solubilidad de las sustancias a la combinación de solventes, la que se hace pasar por la fase móvil; (4) Infrarrojo cercano (NIR): es un tipo de espectroscopia, cuyo objetivo es generar modelos matemáticos que relacionen la composición química con cambios de energía en la región correspondiente al rango infrarrojo cercano; finalmente (5) La espectrometría de masas (MS): utiliza el movimiento de iones en campos eléctricos y magnéticos para clasificarlos de acuerdo a su relación masa-carga.

Conclusión

Existen diversos métodos de extracción de grasas de los alimentos, solubilizando las muestras con solventes orgánicos polares. De esta forma los lípidos obtenidos pueden evaluarse químicamente con métodos específicos como los cromatográficos, NIR, entre otros y así se puede obtener información del tipo lípido y su constitución de ácidos

grasos, utilizando tabla con valores de Rf en el caso de los métodos cromatográficos para saber qué lípido se evalúa o como en el método de NIR que necesita calibrar antes el espectrofotómetro con muestras estándar. Finalmente el uso de los métodos dependerá del tipo de alimento que se quiera evaluar y de los costos que lleve realizar el método tanto en infraestructura como en equipos.

Referencias bibliográficas

Christie, W.; Dobson, G. 1999. Thin-layer chromatography-revisited. *Lipid Technology*. 11: 64-66.

Fuentes, O.; Campos, E. 2006. Guía de laboratorios de bioquímica general. Universidad Santo Tomás.

Newton, T.; Schiferl, I. 1998. TLC, Educational Modules for Chemistry. [en línea]. <<http://www.usm.maine.edu/~newton/TANES/TLC.HTML>> [consulta: 26-04-2009].

Núñez, C. 2008. Extracciones con equipo Soxhlet. [en línea]. <<http://www.cenunez.com.ar>> [consulta: 26-04-2009].

Romero, A. 2002. Cromatografía cursos de Métodos. Instituto de Biotecnología UNAM. México.

Ruffino, J.; Napolitano, F. 2007. Determinación de Aceite/Grasa Total en Alimentos Concentrados utilizando el método LECO/SFE - Extracción con Fluidos Supercríticos. INBOX Technology and Services S.A.

Skoog, D.; West, D.; Holler, F.; Crouch, S. 2005. Fundamentos de química analítica. 8ª edición. Thomson-Paraninfo. Madrid, España.

Universidad de Valencia, Facultad de farmacia, departamento de química analítica. 2006. Fundamentos y funciones de la espectrometría de masas. [en línea]. <<http://mural.uv.es/calooan/>> [consulta: 27-04-2009].

Vásquez, D; Abadía, B; Arreaza, L. 2004. Aplicación de la Espectroscopía de Reflectancia en el Infrarrojo Cercano (NIRS) para la caracterización nutricional del pasto Guinea y del grano maíz. *Revista Corpoica*. 5: 49-55.