

NUEVAS TENDENCIAS EN EL ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS

*J. A. García Regueiro y I. Díaz
IRTA. Centro de Tecnología de la Carne. Unidad de Química Alimentaria.
Granja Camps i Armet. 17121 Monells*

1. INTRODUCCIÓN

El análisis de ácidos grasos es de gran interés para la industria cárnica por las implicaciones tecnológicas, nutricionales y sensoriales que se derivan de su composición (Nicolau y Kokotos, 2004; Sédébio y Christie, 1998; Livisay et al. 2000). Además se han estudiado de forma muy intensa la influencia del sexo, raza, peso y alimentación en la composición y distribución de los ácidos grasos tanto en el tejido muscular como en el subcutáneo (De Smet et al. 2004).

La tendencia a modificar la composición de los ácidos grasos a través de la dieta ha motivado la necesidad de métodos de análisis más precisos y exactos para poder determinar la concentración de ácidos grasos, como por ejemplo algunos del tipo n-3: linolénico, eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA); y otros que han adquirido importancia tanto por sus propiedades en producción animal como por su efecto sobre la salud humana, como el CLA y los ácidos grasos trans. La separación de los isómeros del CLA es un análisis muy complejo y fundamental para poder calcular las concentraciones de los isómeros más activos (Winkler y Steinhart, 2001); esta dificultad se puede extender a los ácidos grasos trans de los ácidos grasos oleico, linoleico y linolénico.

La forma más extendida de cálculo de la composición de ácidos grasos es la de los porcentajes normalizados. Sin embargo, cada vez es más importante el cálculo de las concentraciones de ácidos grasos lo que requiere la validación del método de modo más complejo. Los diferentes métodos de extracción pueden producir concentraciones diferentes, por ello es un aspecto a considerar como previo. El método de extracción más extendido, sin considerar el método oficial para la determinación de grasa total, es el descrito por Folch et al. 1957. Este método ha sido modificado con variantes pero que mantienen el mismo principio de extracción basado en la mezcla de cloroformo y metanol para poder extraer tanto lípidos neutros como polares. Dado el uso de cloroformo se han propuesto otras soluciones de extracción como el hexano:2-propanol, pero que no han sido aplicadas de modo importante.

Una vez extraídos los lípidos se han de saponificar para liberar los ácidos grasos y a continuación formar los ésteres metílicos que se separaran mediante cromatografía de gases. Para producir los ésteres metílicos de los ácidos grasos existen varios métodos que ofrecen resultados comparables pero no completamente similares. Por lo cual este es otro elemento a considerar, sobre todo si se desea identificar ácidos grasos mediante cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (GC-MS).

METODOLOGÍA

Extracción de la grasa:

- A) Método ISO-1443: este método se basa en la digestión de la muestra con ácido clorhídrico 3N y la posterior extracción de la grasa en un Soxhlet con éter de petróleo o éter dietílico, previa desecación del residuo de grasa obtenido durante la acción del ácido. Con este extracto sería posible analizar los ácidos grasos liberados en la digestión.

- B) Método de Folch et al. (1957): la muestra se extrae con una solución de cloroformo:metanol 2:1, la cual, sobre todo en el caso de carne o productos cárnicos, se debe tratar para eliminar el agua extraída en un embudo de decantación para separar la fase orgánica que se recoge, se lava con una solución salina y a continuación se evapora para proceder a calcular el contenido total de grasa y con una alícuota determinar los ácidos grasos.

- C) Método de Bligh and Dyer (1959): es una variante del método de Folch et al. (1957) en la que la proporción de cloroformo:metanol se modifica a 1:1 y en algunos casos a 1:2. El tratamiento posterior consiste en aislar la fase orgánica exenta de agua y tratar el residuo como en el método B.

- D) Métodos de extracción acelerados: esta extracción se puede aplicar con un equipo desarrollado por Dionex denominado ASE (accelerated solvent extraction) o con equipos que aplican microondas. Una solución tipo en ambos casos puede ser: acetato de etilo : ciclohexano (54:46 v/v). (Thurnofer y Vetter, 2005, Weichbrodt et al. 2000)

- E) Extracción con una solución de hexano:2-propanol 2:1. Esta técnica se aplicó como un sustituto de la de Folch et al. (1957) y la de Bligh and Dyer (1959) para evitar el uso de cloroformo. Sin embargo, su utilización es muy limitada.

SAPONIFICACIÓN Y FORMACIÓN DE LOS ÉSTERES METÁLICOS

Una vez extraída la grasa se procede a su saponificación para liberar los ácidos grasos. Esto se consigue con una solución de una base, generalmente NaOH o KOH, en concentraciones en el intervalo 0,3 a 1 N en metanol. En estas condiciones se puede proceder a la formación de los ésteres metílicos añadiendo BF₃ en metanol. Existen otras técnicas de formación de los ésteres metílicos que se basan en una transesterificación en medio básico con metóxido sódico, o también en aislar los ácidos grasos a partir del material saponificado mediante acidificación y posteriormente derivatizar el residuo

recuperado con hexano con soluciones ácidas en metanol: 3N HCl en metanol o 1 – 2 % de H₂SO₄ (95%) en metanol.

SEPARACIÓN DE LOS ÉSTERES METÁLICOS

El procedimiento de separación se basa en la aplicación de la cromatografía de gases acoplada a diferentes detectores, básicamente el de ionización de llama (FID) o la espectrometría de masas que permite la identificación de ácidos grasos minoritarios y asegurar la asignación correcta de picos a ácidos grasos específicos. Las columnas empleadas son de fases estacionarias polares (cianopropilsilicona y polietilenglicol), estas fases permiten la separación por número de dobles enlaces dentro de un grupo de ácidos grasos con el mismo número de átomos de carbono. Las longitudes de las columnas pueden oscilar entre los 30 y los 120 metros en función de los ácidos grasos que se desean determinar y con que resolución. El modo de inyección más aplicado es el denominado con partición (split) dado que, en general, los ácidos grasos están presentes en concentraciones elevadas. Sin embargo, esta inyección puede provocar cierto grado de discriminación al realizarse en caliente, así los ácidos grasos menos volátiles pueden volatilizarse más lentamente que los de mayor volatilidad y dar lugar a respuestas inferiores a las teóricas. Un modo de evitar esta situación es la aplicación de inyecciones en frío con inyector on-column y PTV (inyector de temperatura programada).

DISCUSIÓN

Los métodos de extracción más utilizados son las mezclas de cloroformo: metanol en sus distintas proporciones. Los resultados cuantitativos de estos métodos respecto del método ISO-1443 no suelen diferir de modo importante por lo que se puede concluir que se extraen cantidades similares de lípidos. La digestión en caliente y medio ácido puede provocar la formación de artefactos, la degradación de algunos ácidos grasos y la isomerización de enlaces cis; estos resultados no son críticos para determinar la cantidad total de grasa de un alimento, pero si pueden afectar a la composición de los ácidos grasos. Si en el disolvente o mezcla de extracción no hay un disolvente polar como el metanol resulta difícil extraer los lípidos más polares, algunos de los cuales incluso en presencia de metanol pueden presentar recuperaciones bajas.

En un análisis bibliográfico extenso se puede observar que para determinar los ácidos grasos de la grasa o del tejido muscular, los métodos más usados son los de Folch et al (1957) y el de Bligh y Dyer (1959); se ha de resaltar la antigüedad de estos métodos y por tanto la dificultad para encontrar soluciones equivalentes en rendimiento, al parecer desde los últimos 46 años. En estos métodos la relación del disolvente de extracción es importante pero también la del agua que forma parte de la muestra y que interacciona con los disolventes orgánicos (Christie, 1989).

La determinación de la composición de los ácidos grasos ha sufrido notables cambios desde los últimos quince años. En un principio los datos se reducían a los ácidos grasos mayoritarios: mirístico, palmítico, palmitoleico, esteárico, oleico, linoleico, linolénico y araquidónico. Esto se debía a las dificultades analíticas para obtener más información y a las limitaciones de las columnas de separación con fases estacionarias polares que suelen ser inestables térmicamente. Actualmente se ha extendido el número de ácidos grasos que se determinan y que ayudan a comprender mejor las características de los productos cárnicos y los fenómenos fisiológicos que ocurren en la deposición y metabolismo de los ácidos grasos en el animal vivo. Esto último es de gran importancia en los estudios sobre los efectos de la nutrición animal con distintos tipos de grasas. De este modo la separación de ácidos grasos debe incluir los isómeros de posición y diferenciarlos para poder obtener datos más fiables sobre las relaciones n-6/n-3, Poliinsaturados/Saturados y porcentajes de ácidos como el oleico (C18:1 n-9) que en ocasiones se continúa calculando como la suma de éste isómero y la del C18:1 n-7. De este modo el intervalo de átomos de carbono se ha ampliado desde 10 a 24 átomos de carbono incluyendo una separación de los isómeros n-6 y n-3 de diferentes ácidos grasos como el araquidónico, EPA y DHA.

La utilización de isómeros cis,trans del ácido linoleico conjugado (CLA) en producción animal, así como el hallazgo de sus propiedades beneficiosas para la salud humana, han motivado la necesidad de determinar los isómeros cis,trans CLA en carne y productos cárnicos. Este análisis entraña dificultades importantes para separar todos los isómeros posibles y calcular los porcentajes o concentraciones de aquellos que presentan las propiedades óptimas para la salud humana.

Otro grupo de ácidos grasos de gran relevancia para la salud humana son los trans. Estos ácidos grasos se han asociado al desarrollo de enfermedades cardiovasculares y se han incluido en la estrategia NAOS para promover su reducción. Si bien, la carne y productos cárnicos son fuentes pobres en estos ácidos grasos, se debe evaluar su presencia y los efectos de los diferentes tratamientos tecnológicos. Esta determinación tiene mayor interés en los animales rumiantes debido a que se pueden producir mayores cantidades de ácidos grasos trans.

Las fases estacionarias (tabla 1) que permiten la separación de todos estos tipos de ácidos grasos han sido mejoradas de modo que ha aumentado su polaridad sin producirse una pérdida de estabilidad térmica. La estrategia más extendida ha sido la de aumentar el porcentaje de grupos cianopropil para conseguir más selectividad. Sin embargo, los resultados en algunos casos han sido contradictorios al permitir separar mejor una serie de ácidos grasos pero empeorar la de otros. Si se aplican las diferentes fases descritas en la tabla 1 se puede observar que su selectividad no es la misma, por lo que es de suma importancia cuando se evalúa la composición de ácidos grasos saber con que fase se ha obtenido. Por ejemplo en la columna BPX-70 la elución de los ácidos C24:0, C24:1 y C22:6 n-3 se produce en este orden, pero en una columna con una fase DB-23 el orden de elución es el siguiente: C24:0, C22:6 n-3 y C24:1. Estas consideraciones se pueden aplicar a otros grupos de ácidos

grasos, y además se debería considerar todos los picos que permanecen sin identificar en un cromatograma de ácidos grasos obtenido con suficiente sensibilidad. La figura 1 muestra un cromatograma de ácidos grasos obtenidos a partir de músculo bovino.

La longitud de las columnas permite resolver muchos problemas de separación en el análisis de ácidos grasos. En el análisis de los ácidos grasos trans y de los isómeros del CLA es casi imprescindible utilizar columnas de más de 50 m, hasta alcanzar longitudes de 120 m. Este incremento de longitud tiene la desventaja de un aumento del tiempo de retención y por tanto del tiempo de análisis, pero se puede reducir usando hidrógeno como fase móvil y un sistema de control electrónico de la presión que permita trabajar a presiones relativamente elevadas. De todos modos las velocidades lineales de la fase móvil no deberán superar los valores óptimos para evitar la pérdida de resolución de pares de picos críticos. Es evidente que la mayor parte de análisis de ácidos grasos no se efectúa de este modo, sino que la longitud típica es la de 30 m, con un espesor de fase de 0,2 a 0,3 μm , que si no se desea separar isómeros trans o cis, trans ofrece una resolución suficiente pero también una pérdida de información y solapamientos que pueden ser poco significativos pero que existen.

La forma más adecuada para separar ácidos grasos es convertirlos en ésteres metílicos pero esta reacción debe evitar la formación de artefactos. En medio ácido se pueden producir isomerizaciones por lo que se deberían recurrir a reacciones en medio básico para evitar este fenómeno (Koning et al. 2004). Los derivados FAMES no son los más apropiados para el análisis mediante GC-MS, en el modo de impacto electrónico, dado el grado importante de fragmentación que se produce. Para evitar esta dificultad se pueden obtener otros derivados como los picolinil que permiten obtener espectros donde el ión de masa molecular es más fácil de determinar (Christie, 1989). Otra opción es la aplicación de modos de ionización más suaves como la ionización química que evita la fragmentación pero produce una pérdida de información estructural.

El desarrollo de la técnica de separación GCxGC (comprehensive GC x GC) permite obtener una resolución que no se puede alcanzar con una columna única de separación (Winkler y Steinhart, 2001). Esta técnica se basa en la separación efectuada con dos columnas colocadas en serie y con diferente polaridad, la transferencia de los solutos de una columna a la otra se produce de forma muy rápida de modo que se evita la dispersión del pico proveniente de la primera columna. El componente que entra en la segunda columna sufre una nueva separación dando lugar a cromatogramas en tres dimensiones. En estos cromatogramas se pueden separar isómeros que, o no se separan, o son muy difíciles de separar en la cromatografía de gases convencional. La aplicación de la GCxGC requiere un instrumento específico con detectores de rápida respuesta y en el caso de utilizar la espectrometría de masas se debe empelar un analizador TOF que es el que permite la velocidad necesaria de adquisición de datos.

CONCLUSIÓN

El análisis de ácidos grasos se enfrenta a nuevos retos que exigen la aplicación de técnicas de separación más sofisticadas para obtener datos que permitan conocer mejor la composición de los alimentos y el metabolismo de sus componentes en los seres vivos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la financiación otorgada por el INIA (Ministerio de Educación y Ciencia) proyecto RTA04-026 para la realización de este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

Bligh, E. G., Dyer, W. J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37: 911-917

Christie, W. W. (1989) *Gas Chromatography and lipids: A practical guide*. The Oily Press. Glasgow

De Smet, S., Raes, K., Demeyer, D. (2004). Meat fatty acids composition as affected by fatness and genetic factors: a review. *Anim. Res.*, 53: 81-98

Folch, J., Lees, M., Sloane-Stanley, G. H. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275

Hyötyläinen, T., Kallio, M., Lehtonen, M., Lintonen, S., Peräjoki, P., Jussila, M., Riekkola, M-L. (2004). Comprehensive two-dimensional gas chromatography in the análisis of dietary fatty acids. *J. Sep. Sci.*, 27: 451-458

Koning, S., Janssen, H-G., Deursen, M., Brinkman, U. A. Th. (2004) Automated on-line comprehensive two-dimesional LC xGC and LC x GC –ToF MS: instrument design and application to edible oil and fat analysis. *J. Sep. Sci.*, 27: 397-409

Livisay, S. A., Zhou, S., Ip, C., Decker, E. A. (2000) Impact of dietary conjugated linoleic acid on the oxidative stability of rat liver microsomes and skeletal muscle homogenates. *J. Agric. Food Chem.*, 48: 4162-4167

Nicolau, A., Kokotos, G. (2004). *Bioactive lipids*. The Oily Press. Bridgewater, England

Sébedio, J.L., Christie, W.W. (1998). *Trans fatty acids in human nutrition*. The Oily Press. Dundee

Thurnofer, S., Vetter, W. (2005) A gas chromatopgraphy/electrón ionization-mass spectrometry-selected ion monitoring method for determining the fatty acid pattern in food after the formation of fatty acid methyl esters. *J. Agric. Food Chem.*, 53: 8896-8903

Weichbrodt, M., Vetter, W., Lucas, B. (2000) Microwaved-assisted extraction and accelerated solvent extraction with the solvent mixture ethyl acetate/cyclohexane (1:1, v:v) in view of quantitative determination of organochlorinesin fis tissue. *J. AOAC Int.*, 83: 1334-1343

Winkler, K., Steinhart, H. (2001). Identification of conjugated isomers of linoleic acid and arachidonic acid in cheese. *J. Sep. Sci.*, 24: 663-668

