METODOS DE DERIVATIZACION DE ACIDOS GRASOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS LINOLEICO CONJUGADOS EN CARNE

Aldai N.[1], Nájera AI.[2], Osoro K.[1]
[1]S.E.R.I.D.A., Apdo. 13, 33.330 Villaviciosa, Asturias. E-mail: naldai@serida.org
[2] Área de Tecnología de Alimentos, Facultad de Farmacia, Universidad de País Vasco/Euskal-Herriko Unibertsitatea, Paseo de la Universidad 7, 01006 Vitoria

INTRODUCCION

En la actualidad son abundantes los trabajos de investigación que destinados al conocimiento de la calidad de la carne se centran en el estudio cualitativo de la grasa, y concretamente en la identificación y cuantificación de los ácidos grasos totales. Este tipo de estudios comprenden las siguientes etapas: extracción previa de los lípidos, derivatización de los grupos acilo para su conversión en moléculas menos polares y más volátiles, purificación en caso necesario y finalmente su identificación y cuantificación por cromatografía de gases, siendo ésta la técnica empleada de forma rutinaria tanto por su rapidez como por su alta resolución y sensibilidad (Horning *et al.*, 1964). La etapa de derivatización, reacción química a primera vista sencilla, se convierte en etapa clave cuando se requiere la cuantificación de los ácidos linoleico conjugados (CLA).

Los CLA engloban a una gran variedad de isómeros geométricos y posicionales del ácido α-linoleico ($C_{18:2}$) que se encuentran predominantemente en la grasa de origen animal, fundamentalmente en especies rumiantes. Su síntesis tiene lugar en el rumen de los animales debido a la biohidrogenación bacteriana del ácido α-linoleico (Kepler and Tove, 1967), la cual se ve favorecida en condiciones de ingestión de pasto (Dhiman *et al.*, 1996; Kelly *et al.*, 1998). La importancia de la determinación de los CLA radica en que diversos autores han reconocido su actividad terapeútica, especialmente del isómero *c*-9, *t*-11 $C_{18:2}$ (Ha *et al.*, 1990; Chin *et al.*, 1992).

En este trabajo se recoge una extensa revisión bibliográfica sobre los métodos de derivatización de los ácidos grasos, así como una valoración de las ventajas e inconvenientes en la aplicación para la determinación de CLA.

METODOS DE DERIVATIZACION

Derivatización en una o en dos etapas con empleo de catalizadores ácidos o alcalinos:

1) Transesterificación directa. Implica un único paso con catalizador ácido o alcalino.
2) Saponificación seguida de metilación. Implica una saponificación o hidrólisis alcalina para liberar los ácidos grasos en forma de acilglicéridos, seguido de una metilación en presencia de un catalizador ácido.

A) Métodos de catálisis ácida.

Tanto las transesterificaciones como las metilaciones con saponificación previa son posibles con catalizadores ácidos. Los más empleados son el trifloruro de boro, ácido clorhídrico y ácido sulfúrico, todos ellos en metanol. Estos esterifican tanto los ácidos grasos libres como los acilglicéridos, para lo cual se emplean

temperaturas bastante elevadas (100°C) que conllevan la posible pérdida de moléculas inestables al calor como pueden ser los CLA (Park *et al.*, 2002). Además, en varios estudios recientes se comprueba que cambian la distribución de los dobles enlaces conjugados, es decir producen isomerización en el que las combinaciones de isómeros *c, t* y *t, c* pasan a *t, t* al ser esta última más estable que las anteriores, y además producen artefactos de tipo metoxi (Kramer *et al.*, 1997; Yamasaki *et al.*, 1999; Park *et al.*, 2001). Esto ocurre sobre todo cuando junto a las altas temperaturas se emplean tiempos prolongados de reacción. Sin embargo, cuando se aplican temperaturas más suaves con tiempos prolongados, aunque la isomerización y la formación de artefactos disminuyen notablemente, la esterificación de los acilgliceridos puede no ser completa (Werner *et al.*, 1992; Yurawecz *et al.*, 1999). Para evitar la isomerización de los linoleicos conjugados Park *et al.* (2002) proponen la adición de antiisomerizantes como el dimetilsulfoxido (DMSO) y el dimetilformamida (DMF) en la mezcla de reacción, los cuales parecen inhibir la interacción entre los alcoholes protonados y los dobles enlaces. Aunque diversos autores aconsejan la utilización de métodos combinados en dos etapas como alternativa a la metanolisis ácida y evitar sus defectos, con una saponificación previa y metilación ácida posterior más suave siguen produciéndose los procesos de isomerización y formación de artefactos (Shantha *et al.*, 1993; Kramer *et al.*, 1997).

B) Métodos de catálisis alcalina

Se trata básicamente de transesterificaciones con catalizadores básicos, donde una de las condiciones más estrictas es la ausencia de agua en la mezcla de reacción ya que su presencia implicaría la saponificación de los ácidos grasos como reacción irreversible anulando la metilación de los mismos (Christie, 1989; Hammond, 1993; Shantha *et al.*, 1993).

Los más empleados, entre otros, son el metóxido sódico, el hidróxido potásico en metanol y la tetrametilguanidina en metanol. En general las reacciones se dan a temperaturas suaves (50°C), incluso a veces a temperatura ambiente, por lo que no se produce la isomerización de los linoleicos conjugados ni artefactos tipo metoxi (Shantha *et al.*, 1993; Kramer *et al.*, 1997). En cambio, estos esterifican únicamente los acilglicéridos y no los ácidos grasos libres ni los que llevan un enlace tipo amida (esfingolípidos o glucoesfingolípidos). Y tampoco esterifican los ácidos grasos de cadena corta, (Christie, 1982; Banni *et al.*, 1995). Además, en estos casos es muy importante tener en cuenta el lavado de las muestras antes de inyectarlos en el cromatógrafo para evitar que se produzcan picos extraños debidos a restos de reactivo en la muestra a analizar (Bannon *et al.*, 1982).

Como alternativa a los catalizadores ácidos y alcalinos, en la bibliografia de los ultimos años (Enser *et al.*, 1999, 2000; Fritsche *et al.*, 2000; Scollan *et al.*, 2001) se hace referencia al empleo de diazometano para la determinacion de CLA en alimentos como leche y carne y sus derivados. Se trata de un gas tóxico que se obtiene por destilación y se recoge normalmente en éter dietílico. Hoy día, debido a su alta toxicidad y peligrosidad en su obtención, se comercializa estabilizado en forma de solución de trimetilsilildiazometano en hexano o en éter dietílico (Sigma-Aldrich), cuya efectividad ya fue corroborada por Hashimoto y colaboradores en el año 1981. Únicamente esterifica los ácidos grasos libres con lo cual es importante hidrolizar previamente la muestra con un álcali o aplicar una transesterificación

alcalina al final para acabar de esterificar los acilglicéridos (Christie, 1982). La esterificación es instantánea en presencia de metanol y trimetilsilildiazometano en exceso en la mezcla de reacción, y se monitoriza fácilmente con el control de la desaparición del color amarillento peculiar que aporta este reactivo. Además, trabaja en condiciones suaves, no produce isomerización de los ácidos linoleicos conjugados y según Kramer *et al.* (1997) no produce artefactos de tipo metoxi. Sin embargo, en el estudio llevado a cabo por Park *et al.* (2001) se detectaron artefactos debidos a moléculas de trimetilsilil e impurezas al inicio de los cromatogramas que podrían interferir con ácidos grasos de cadena corta, por otra parte, de poca importancia en la carne.

A la vista de los resultados publicados, el empleo del trimetilsilildiazometano parece ser una buena alternativa para la determinación de los ácidos linoleicos conjugados en alimentos como la carne.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Banni S., Day BW., Evans RW., Corongiu FP., Lombardi B. 1995. J. Nutr. Biochem. 6: 281-289.

Bannon CD., Breen GJ., Craske JD., Hai NT., Harper NL., O'Rourke KL. 1982. J. Chromatogr. 247: 71.

Chin SF., Liu W., Storkson JM., Ha YL., Pariza WM. 1992. J. Food Compos. Anal. 5: 185-197.

Christie WW. 1982. 2nd edn., Pergamon Press, Oxford.

Christie WW. 1989. The Oily Press Ltd., Ayr, Scotland.

Dhiman TR., Anand GR., Satter LD., Pariza MW. 1996. J. Dairy Sci. 79 (S1): 137.

Enser M., Richardson RI., Wood JD., Gill BP., Sheard PR. 2000. Meat Sci. 55: 201-212.

Enser M., Scollan ND., Choi NJ., Kurt E., Hallett K., Wood JD. 1999. Anim. Sci. 69: 143-146.

Fritsche J., Fritsche S., Solomon MB., Mossoba MM., Yurawecz MP., Morehouse K., Ku Y. 2000. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 102:667-672.

Ha YL., Storkson J., Pariza MW. 1990. Cancer Res. 50: 1097-1101.

Hammond EW. 1993. CRC Press, Boca Raton, Florida.

Hashimoto N., Aoyama T., Shioiri T. 1981. Chem. Pharm. Bull. 29(5): 1475-1981.

Horning EC., Ahrens EH Jr., Lipsky SR., Mattson FH., Mead JF., Turner DA., Goldwater WH. 1964. J. Lipid Res. 5: 20-27.

Kelly ML., Kolver ES., Bauman DE., Van Amburgh ME., Muller LD. 1998. J. Dairy Sci. 81: 1630-1636.

Kepler CR., Tove SB. 1967. J. Biol. Chem. 242: 5686-5692.

Kramer JKG., Fellner V., Dugan MER., Sauer FD., Mossoba MM., Yurawecz MP. 1997. Lipids 32: 1219-1228.

Park SJ., Park CW., Kim SJ., Kim JK., Kim YR., Park KA., Kim JO., Ha YL. (2002). J. Agric. Food Chem. 50: 989-996.

Park Y., Albright KJ., Cai ZY., Pariza MW. 2001. J. Agr. Food Chem. 49: 1158-1164.

Scollan ND., Choi NJ., Kurt E., Fisher AV., Enser M., Wood JD. 2001. British J. Nutr. 85: 115-124.

Shantha NC., Decker EA., Hennig B. 1993. JAOAC International 76(3): 644-649.

Werner AS., Luedecke LO., Shultz TD. 1992. J Agric. Food Chem. 40: 1817-1821.

Yamasaki M., Kishihara K., Ikeda I., Sugano M., Yamada K. 1999. JAOCS 76(8): 933-938.

Yurawecz MP., Sehat N., Mossoba MM., Roach JAG., Kramer JKG., Ku Y. 1999. Fett/Lipid 101(8): S277-282.