

PUESTA A PUNTO DE UN MÉTODO ANALÍTICO MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE GASES PARA LA DETERMINACIÓN DEL PERFIL LIPÍDICO EN CARNES

REFINEMENT OF AN ANALYTIC METHOD FOR DETERMINATION OF LIPID PROFILE IN MEAT BY GAS CHROMATOGRAPHY

E. M. Rincón Zoot^{1*}, W. Albarracín PhD²

Recibido: Abril 03 de 2013 Aceptado: Octubre 08 de 2013

RESUMEN

Antecedentes: La caracterización y cuantificación de perfiles lipídicos, por medio de cromatografía de gases, permite establecer las características nutricionales y propiedades funcionales de los ácidos grasos presentes en los alimentos. Sin embargo, en la determinación de perfiles lipídicos existen varias condiciones que afectan su cuantificación; además, en los métodos analíticos utilizados para la determinación de perfiles lipídicos en matrices cárnicas no se dispone de un consenso sobre las etapas de extracción y derivatización. **Objetivos:** Evaluar las mejores condiciones para la cuantificación de ésteres metílicos, variando la cantidad de muestra cárnica y el volumen de metóxido de sodio o trifluoruro de boro, empleados en la etapa de derivatización de un método analítico utilizado para la determinación de un perfil lipídico en carnes bovinas. **Métodos:** Las condiciones evaluadas fueron: el tipo y la cantidad de reactivos de derivatización (metóxido de sodio 250 μL y 500 μL ; trifluoruro de boro 700 μL), cantidad inicial de muestras cárnica (3,0 y 6,0 g) y extracción de grasa según método Folch *et al.*, 1957 (9). La derivatización de triglicéridos y metilación de ácidos grasos tuvo una reacción de 45 minutos para metóxido de sodio y 15 minutos para trifluoruro de boro. Finalmente, la cuantificación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos se hizo con un cromatógrafo de gases Agilent 7890^a (Agilent, USA), empleando un detector FID. **Resultados:** No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) al comparar las combinaciones entre cantidades de muestras, tipo y volumen de reactivos de derivatización empleados. Se encontraron valores de ésteres metílicos de ácidos grasos (%P/P) saturados de $58,694\% \pm 2$, monoinsaturados de $33,999\% \pm 2,4$ y poliinsaturados de $7,304\% \pm 2,8$. **Conclusiones:** La cuantificación de los ésteres metílicos de ácidos grasos en carne bovina por cromatografía de gases demostró ser eficiente y no se encontraron diferencias estadísticas al comparar la cantidad de muestra cárnica, el tipo de reactivo (metóxido de sodio o trifluoruro de boro) y volumen de reactivo empleados en la etapa de derivatización. La mayoría de los ácidos grasos cuantificados reportan valores similares para ese mismo tipo de posta cárnica. **Palabras clave:** Ácidos grasos, carne, derivatización, cromatografía de gases.

¹ Estudiante Maestría en Ciencia y Tecnología de alimentos. Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Grupo de investigación Aseguramiento de la calidad y desarrollo de nuevos productos. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá Colombia.

² Docente Ingeniería Agroindustrial Universidad de Nariño. Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Grupo de investigación Aseguramiento de la calidad y desarrollo de nuevos productos. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá Colombia.

* Autor a quien se debe dirigir la correspondencia: emrincons@unal.edu.co

ABSTRACT

Background: The Characterization and quantification of lipid profiles by gas chromatography allows establishing functional and nutritional properties of fatty acids in foods. However, there is no agreement about the extraction and derivatization stages reported in analytical methods used in determination of lipid profiles in meat matrices. **Objectives:** Determination of the best conditions for the quantification of methyl esters, varying some conditions like the amount of meat and the volume of sodium methoxide or boron trifluoride used in the derivatization step of an analytical method used for determination of lipid profile in beef meat. **Methods:** The evaluated conditions were the quantity and type of organic solvents (sodium methoxide 250 μ L and 500 μ L; boron trifluoride 700 μ L), quantity of sample (3.0 g and 6.0 g) and fat extraction method used according to Folch *et al.*, 1957 (9). The derivatization of triglycerides and fatty acids had methylation reaction with sodium methoxide for 45 minutes, and for 15 minutes with boron trifluoride, ending with the quantification of methyl esters of fatty acids by gas chromatography. **Results:** There was no statistically significant differences ($p > 0.05$) when comparing combinations between the amounts of samples, type and number of derivatizing reagents employed. It was found values of fatty acid methyl esters (%w/w) saturated of $58.694\% \pm 2\%$, $33,999 \pm 2.4$ of monounsaturated and $7,304\% \pm 2.8$ of polyunsaturated. **Conclusions:** Quantification of fatty acid methyl esters in beef by gas chromatography was shown to be effective and there was no statistical difference when comparing the amount of meat sample, type of reagent (sodium methoxide or boron trifluoride) and reagent volume employed in the derivatization step. The majority of fatty acids reported similar values for the same type of meat post. **Keywords:** Fatty acids, meat, derivatization, gas chromatography.

INTRODUCCIÓN

En los alimentos se encuentran ácidos grasos (AG) de cadena mediana y larga (C_{14} - C_{22}). La mayoría de los nutricionistas distinguen los ácidos C_8 , C_{10} , C_{12} como de cadena corta, mientras que a los C_{16} y C_{18} como de cadena larga. Los primeros se digieren fácilmente y, durante la absorción, pasan directamente al hígado, a través de la vena porta; mientras que los segundos tienden a transferirse a la linfa en los quilomicrones (1, 2).

En carne bovina, los ácidos grasos reportados varían desde cadenas medias a largas, tanto saturados como insaturados, siendo el palmitato ($C_{16:0}$), estearato ($C_{18:0}$) y el oleato ($C_{18:1}$) los mayoritarios. En carne, la composición de ácidos grasos intramuscular genera un grupo heterogéneo de estructuras químicas con efectos profundos sobre la calidad de este tipo de alimento. Por su parte, la composición de AG determina la estabilidad oxidativa de los músculos, los cuales a su vez afectan el sabor, color y valor nutricional de la carne (3).

En general, se considera necesario precisar la composición, el tipo (saturados o insaturados) y proporción de AG presentes en la carne debido a su posible efecto sobre el desarrollo de enfermedades, en especial cardiovasculares. Por ello, los temas relacionados con estos aspectos se consideran como objetos importantes de investigación (4, 5).

En la dieta humana el desbalance de ácidos grasos y grasas intramusculares de carne de rumiantes ha generado la necesidad de mejorar la nutrición y salud de vacunos, al igual que la manipulación de los AG, con el objetivo de favorecer la proporción entre saturados e insaturados (6).

Aunque en el proceso de análisis de lípidos la preparación de la muestra depende del tipo de alimento y la naturaleza de los lípidos (7), generalmente se realiza un proceso de transesterificación en medio ácido (MeOH/BF₃, MeOH/AcCl, etc.) o básico (MeONa, MeOH/KOH, etc.). Reacción con la que producen ésteres metílicos de ácidos grasos, derivados estables y fácilmente cuantificables por cromatografía de gases o por técnicas de espectros de masa (8).

Sin embargo, en la determinación de perfiles lipídicos existen varias condiciones que afectan su cuantificación; además, en los métodos analíticos utilizados para la determinación de perfiles lipídicos en matrices cárnicas no se dispone de un consenso sobre las etapas de extracción y derivatización. Por ello, el objetivo del presente trabajo fue evaluar las mejores condiciones para la cuantificación de ésteres metílicos, variando la cantidad de muestra cárnica y el volumen de metóxido de sodio o trifluoruro de boro empleado en la etapa de derivatización de un método analítico utilizado para la determinación de un perfil lipídico en carnes bovinas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la determinación de grasas se utilizó un método de extracción por reactivos de derivatización. Las condiciones que variaron en dos niveles fueron: reactivo de derivatización, solvente, tiempo de reacción y cantidad de muestra. En la derivatización se utilizaron volúmenes de 250 y 500 μL de metóxido de Sodio 0,5 M (Sigma Aldrich); mientras que para el método de trifluoruro de boro (Sigma Aldrich) se utilizó 700 μL . Además, el tiempo de reacción fue de 45 minutos para metóxido de sodio y de 15 minutos para trifluoruro de boro.

Muestras cárnicas

Se pesaron muestras cárnicas de 3 y 6 gramos, tomadas del musculo *Longissimus Dorsi* de animales raza Cebu Brahman, provenientes del mismo lote, con las mismas condiciones de crianza y alimentados al pastoreo. Las respectivas muestras se sometieron a un picado fino en estado de congelación.

Extracción de la grasa

En los tejidos musculares los triacilgliceroles se extrajeron por partición con cloroformo-metanol 2:1 según el método propuesto por Folch *et al.*, 1957 (9), agregando 1 mL de la mezcla de reactivos de derivatización por cada g de carne usado, luego se centrifugó a 3500 rpm durante 10 min y se adicionaron 7 mL de KCl 0,88% p/v para separar el precipitado proteico remanente. La fase orgánica se separó, se secó con Na_2SO_4 , se concentró por roto-evaporación y, finalmente, la muestra de grasa se secó con burbujeo de nitrógeno. La grasa extraída se almacenó en un ultra-congelador, para evitar cambios en las proporciones de los ácidos grasos por enranciamiento lipídico.

Derivatización de los triglicéridos y metilación de ácidos grasos

En un vial se pesaron unos 20 mg de grasa en estado semisólido a temperatura ambiente. Debido a la necesidad de que la muestra esté en estado líquido, la grasa se fundió a una temperatura $< 45^\circ\text{C}$. Posteriormente, se agregó 1 mL de hexano, se homogenizó y se adicionaron 250 μL de solución de metóxido de sodio 0,5 M, como lo describe Christie *et al.*, (10), agitando en vortex por 30 segundos. La reacción de derivatización se llevó a cabo a 45°C por 30 minutos. Para el caso del método de derivatización, empleando trifluoruro de boro, se utilizaron

700 μL al 14% en metanol y un tiempo de reacción de 15 minutos a 70°C . Al cabo de este tiempo, para detener la reacción, se adicionaron 4 mL de hexano y 4 mL de solución saturada de NaCl, y la mezcla se agitó en vortex por 30 segundos. La fase orgánica se filtró en sulfato de sodio anhidro y se recuperó en un nuevo vial. A la fase acuosa se le adicionaron 5 mL de hexano, homogeneizando nuevamente en el vortex por 30 segundos; posteriormente, la fase orgánica se filtró en sulfato de sodio y se recuperó en el mismo vial con la fase orgánica anterior. En un vial de cromatografía con inserto se adicionaron 50 μL de la muestra derivatizada y 150 μL de hexano grado cromatográfico.

Cuantificación de ésteres metílicos de ácidos grasos

El análisis de los ésteres metílicos de los AG de cada una de las muestras derivatizadas y diluidas se realizó utilizando cromatografía en fase gaseosa (GC), para lo cual se usó un cromatógrafo de gases Agilent 7890^a (Agilent, USA), equipado con un auto muestreador y auto-inyector Agilent 7683B, un detector FID y un software de captura de datos Chemstation versión B.04.01. La columna utilizada fue BPX-70 30m*0.25m*0.25 μm (SGE, Australia).

El programa de temperatura comenzó a 60°C por 1 minuto, incrementando hasta 190°C a $20^\circ\text{C}/\text{minuto}$ y se mantuvo a 190°C durante 12.5 minutos, para un tiempo total de análisis de 43 minutos. El gas de arrastre utilizado fue helio a un flujo de 2,0 mL/minuto.

El volumen de inyección fue de 1,0 μL y se utilizó un split de 1:20. La composición cualitativa de ácidos grasos se determinó por comparación de los tiempos de retención de los picos obtenidos con los de patrones de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES) C4-C32 (Supelco[®] 37 Component Fatty Acid Methyl Esters Mix) y CLAs, Linoleic acid, conjugated methyl ester (Sigma Aldrich[®] O5632). Para la cuantificación de los mismos se utilizó el método de estándar interno, con curvas de calibración construidas para cada uno de los AG analizados. Se trabajó con patrones internos referidos a compuestos puros agregados a una muestra en una concentración conocida, con el propósito de eliminar la necesidad de medir tamaños de muestra en los análisis cuantitativos y para corregir la variación instrumental (11). Para este caso, se empleó ácido undecenoico como primer patrón interno antes de la metilación y undecanoato de metilo como patrón

interno número dos, el cual fue adicionado luego de la incubación y metilación de los esteres metílicos.

Análisis Estadístico

La evaluación estadística se realizó a través del software Statgraphic Centurión XV.II, considerando cantidad de muestra cárnica, tipo y cantidad de reactivos de derivatización y su interacción como efectos principales; además, se realizó un diseño experimental completamente al azar con componente factorial completo.

Debido a la utilización de diferentes proporciones de reactivos de derivatización, sumado al hecho de que los niveles usados en cada grupo el reactivo fue el mismo, se pudo diferenciar los reactivos de derivatización por los volúmenes o concentraciones. Por tanto, dentro del diseño factorial no se incluyen como factor; adicionalmente, tampoco se incluyó el tiempo de reacción para cada uno de los reactivos de derivatización usados.

Las observaciones fueron tomadas como mínimo por triplicado. Los datos obtenidos se analizaron con un modelo estadístico completamente al azar, acorde con la ecuación 1:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \varepsilon_{ij} \quad \text{Ecuación 1.}$$

Donde: Y_{ij} = Respuesta de la variable; μ = Media general de la variable; α = Efecto del tamaño de muestra; $i = 2$; β = Efecto de la cantidad de reactivos de derivatización; $j = 3$; ε_{ij} = Error experimental.

RESULTADOS

La cantidad de grasa presente en la posta de *Lon-gissimus dorsi* fue de 2,25 +/- 0,2 % de grasa total, con un n = 20 animales.

El proceso de derivatización generó los resultados indicados en la tabla 1.

Tabla 1. Perfiles lipídicos obtenidos con derivatización CH₃OH-CH₃ONa versus perfiles reportados en literatura en %w/w.

Ácidos Grasos	Resultados del presente trabajo					Resultados Otros trabajos				
	Autor	Cebú Brahman				Betancour 2009	Alfaia 2007		Rule 2002	
	Raza	Cebú Brahman				Cebú Comercial	Arouqueza O	Arouqueza P	Cruce Italia	Cruce Italia
Reactivo Derivatización		CH ₃ OH - CH ₃ ONa	Alltech™ Meth-Prep II	CH ₃ OH - CH ₃ ONa	CH ₃ OH - CH ₃ ONa	CH ₃ OH -HCl	CH ₃ OH -HCl			
Cantidad Reactivo (μL)/ Muestra Carne (g)		250/6	500/6	250/3	500/3	25	500	500	350	350
dodecanoato (C12:0)		0,223 ± 0,122	0,154 ± 0,072	0,315 ± 0,131	0,385 ± 0,075		0,220	0,200		
miristato (C14:0)		3,827 ± 1,294	3,042 ± 0,305	3,942 ± 0,438	3,520 ± 0,204	3,200	4,590	4,420	2,030	2,660
miristolato (C14:1)		0,406 ± 0,048	0,429 ± 0,097	0,569 ± 0,054	0,558 ± 0,034		0,680	0,630	0,600	0,390
pentadecanoato (C15:0)		0,978 ± 0,160	0,883 ± 0,038	1,074 ± 0,178	0,910 ± 0,061		0,630	0,670	1,540	0,420
pentadecenoato (C15:1) cis-10		0,449 ± 0,019	0,442 ± 0,036	0,516 ± 0,057	0,449 ± 0,023					
palmitato (C16:0)		28,775 ± 1,441	27,464 ± 0,953	30,917 ± 7,037	28,013 ± 0,777	30,900	23,300	23,600	22,200	25,800
palmitoleato (C16:1)		2,423 ± 0,157	2,459 ± 0,044	3,078 ± 0,253	2,932 ± 0,093		3,110	3,710	2,670	3,750
heptadecanoato (C17:0)		1,327 ± 0,163	1,352 ± 0,044	1,529 ± 0,311	1,342 ± 0,026		1,030	1,100	1,320	1,200
heptadecenoato (C17:1) cis-10		0,595 ± 0,065	0,694 ± 0,073	0,729 ± 0,012	0,694 ± 0,048					
estearato (C18:0)		21,984 ± 0,779	21,198 ± 1,028	18,584 ± 0,604	19,491 ± 0,627	22,700	16,700	16,300	13,400	23,500
elaidato (C18:1)		0,729 ± 0,068	0,689 ± 0,153	0,739 ± 0,244	0,613 ± 0,079					
oleato (C18:1) o		29,325 ± 0,938	28,960 ± 1,369	32,446 ± 6,095	30,398 ± 1,029	36,200				
linolelaidato (C18:2t)		0,811 ± 0,042	0,776 ± 0,088	0,900 ± 0,212	0,733 ± 0,018		0,330	0,370		
linoleato (C18:2c)		2,152 ± 0,723	3,182 ± 0,452	1,336 ± 0,349	1,633 ± 0,124	3,000	3,890	3,270	4,100	3,110
linolenato (C18:3)		0,858 ± 0,229	1,261 ± 0,212	0,764 ± 0,092	0,744 ± 0,080	0,900			1,480	0,220
araquidato (C20:0)		0,417 ± 0,070	0,498 ± 0,069	0,506 ± 0,088	0,404 ± 0,045					
ALC octadecadienoico (C18:2) 9c-11		1,405 ± 0,470	1,929 ± 0,514	2,055 ± 0,684	1,719 ± 0,333				0,410	0,260
ecosenoato (C20:1) cis-11		0,209 ± 0,092	0,235 ± 0,050	0,322 ± 0,011	0,230 ± 0,059				0,140	0,000
ac. cicosatrienoico (C20:3) cis-8,11,14		0,438 ± 0,293	0,453 ± 0,065	1,181 ± 1,207	0,327 ± 0,182				0,090	0,020
docosenoato (C22:1) cis-13		0,178 ± 0,054	0,228 ± 0,044	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000				0,390	0,240
ac. cicosapentaenoico (C20:5)		0,324 ± 0,161	0,567 ± 0,106	0,000 ± 0,000	0,211 ± 0,026	0,400	0,480	0,280	0,620	0,130
docosahexaenoico (C22:6)		0,553 ± 0,125	1,085 ± 0,163	0,977 ± 0,826	0,424 ± 0,048		0,380	0,120		
Saturados		59,108 ± 2,184ab	56,708 ± 0,27a	57,825 ± 0,694ab	58,453 ± 0,644ab					
Mono-Insaturados		33,78 ± 0,326a	33,101 ± 1,22a	34,967 ± 2,654ab	35,408 ± 1,091ab					
Poli-insaturados		7,112 ± 1,905a	10,19 ± 1,495ab	7,206 ± 3,001ab	6,137 ± 0,666a					

Tabla 2. Perfiles lipídicos obtenidos con derivatización CH₃OH – BF₃ versus perfiles reportados en literatura en %w/w.

Ácidos Grasos	Autor	Resultados del presente trabajo		Resultados Otros trabajos					
				Muchenje 2009			Betancour 2009	Rule 2002	
				Raza	Cebú Brahaman	Nguni	Bonsmara	Angus	Cebú Comercial
Reactivo Derivatización		CH ₃ OH–BF ₃	Alltech™ Meth-Prep II	CH ₃ OH–HCl	CH ₃ OH–HCl				
Cantidad Reactivo (μL)/ Muestra Carne (g)		700/6	700/6	700	700	700	25	350	350
dodecanoato	(C12:0)	0,986 ± 0,487	0,688 ± 0,208						
miristato	(C14:0)	3,731 ± 0,477	3,813 ± 0,583	1,610	1,690	1,510	3,200	2,030	2,660
miristoleato	(C14:1)	0,472 ± 0,106	0,466 ± 0,105	0,150	0,200	0,210		0,600	0,390
pentadecanoato	(C15:0)	0,937 ± 0,466	1,008 ± 0,109	0,410	0,410	0,440		1,540	0,420
pentadecenoato	(C15:1) cis-10	0,496 ± 0,028	0,454 ± 0,025	0,220	0,240	0,210			
palmitato	(C16:0)	29,432 ± 2,316	29,478 ± 1,343	21,720	21,850	22,320	30,900	22,200	25,800
palmitoleato	(C16:1)	2,448 ± 0,042	2,668 ± 0,230	2,290	2,250	2,260		2,670	3,750
heptadecanoato	(C17:0)	1,454 ± 0,131	1,349 ± 0,151	1,050	1,050	1,070		1,320	1,200
heptadecenoato	(C17:1) cis-10	0,711 ± 0,090	0,620 ± 0,102	0,380	0,460	0,370			
estearato	(C18:0)	21,628 ± 1,813	21,607 ± 2,286	18,390	18,280	18,750	22,700	13,400	23,500
elaidato	(C18:1)	0,656 ± 0,033	0,707 ± 0,096	1,280	1,400	1,740			
oleato	(C18:1) o	26,991 ± 1,755	30,370 ± 0,348	29,870	29,610	31,070	36,200		
linolelaidato	(C18:2t)	0,798 ± 0,047	0,792 ± 0,074						
linoleato	(C18:2c)	2,373 ± 0,890	1,181 ± 0,216	2,410	2,490	2,210	3,000	4,100	3,110
linolenato	(C18:3)	0,994 ± 0,284	0,567 ± 0,157				0,900	1,480	0,220
araquidato	(C20:0)	0,541 ± 0,127	0,406 ± 0,054	0,230	0,180	0,210			
ALC octadecadienoico	(C18:2) 9c-11	1,900 ± 0,667	1,299 ± 0,411	0,340	0,310	0,330		0,410	0,260
eicosenoato	(C20:1) cis-11	0,457 ± 0,341	0,178 ± 0,049					0,140	0,000
ac. eicosatrienoico	(C20:3) cis-8,11,14	0,364 ± 0,083	0,206 ± 0,082					0,090	0,020
docosenoato	(C22:1) cis-13	0,221 ± 0,082	0,000 ± 0,000					0,390	0,240
ac. eicosapentaenoico	(C20:5)	0,489 ± 0,128	0,154 ± 0,044	1,950	2,040	2,000	0,400	0,620	0,130
docosahexanoico	(C22:6)	0,840 ± 0,345	0,274 ± 0,091	0,160	0,060	0,080			
Saturados		59,9 ± 3,748	60,173 ± 1,509						
Mono-Insaturados		31,607 ± 1,861	35,134 ± 0,828						
Poli-insaturados		8,491 ± 2,196	4,691 ± 0,887						

* Letras iguales indican que no presentan diferencias estadísticamente significativas.

La experimentación se realizó por medio de un diseño multifactorial siguiendo los procedimientos para una sola vía, las respectivas comparaciones entre medias para cada uno de los ácidos grasos, logrando resultados por grupos (ácidos grasos saturados, mono y poli-insaturados).

En una muestra cárnica de 6,0 gramos, empleando 250 μL de metóxido de sodio se encontraron valores de esteres metílicos de ácidos grasos saturados de 59,108%, mono-insaturados 33,780% y poliinsaturados 7,112%; mientras que con un volumen de 500 μL de metóxido de sodio se encontró un valor de ácidos grasos saturados de 56,708%, mono-insaturados 33,101% y poliinsaturados 10,190%. Por su parte, con 700 μL de trifluoruro de boro se cuantificaron valores del 59,900% de AG saturados, 31,107% de mono-insaturados y 8,491% de poliinsaturados. Así mismo, partiendo de una muestra cárnica de 3,0 gramos los porcentajes de esteres metílicos de ácidos grasos en (%p/p) hallados empleando

250 μL de metóxido de sodio fueron 57,825% de ácidos grasos saturados, 34,967 % mono-insaturados y 7,206 % poliinsaturados; mientras que con un volumen de 500 μL de metóxido de sodio los valores fueron de 58,453% de AG saturados, 35,408 % de mono-insaturados y 6,137 % de poliinsaturados. Por su parte, con 700 μL de trifluoruro de boro los resultados fueron de 60,173% de saturados, 35,134% de mono-insaturados y 4,691% de poliinsaturados. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas (p > 0,05) al comparar las combinaciones de cantidades de muestras, tipo y volumen de reactivos de derivatización empleados.

En la tabla 1 y 2 se aprecia que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el uso de las interacciones de cantidad de muestra cárnica, concentración de reactivos de derivatización ni método de derivatización, lo cual indica que se puede usar cualquiera de los dos tipos de compuestos y que las proporciones no afectan en

forma significativa la cuantificación de los ésteres metílicos por cromatografía de gases.

DISCUSION

En general, los resultados del presente estudio (tablas 1, 2 y 3) muestran que la caracterización y cantidad de ácidos grasos saturados no presentan diferencias significativas por el tipo o volumen del reactivo utilizado para la derivatización. De igual manera, no hay diferencias significativas por la cantidad de muestra cárnica utilizada. Por ello, desde una perspectiva práctica, en la caracterización y cuantificación de los ácidos grasos saturados en muestra de carne vacuna se debería utilizar 250 μ L de metóxido de sodio en metanol para la derivatización, debido a que es la opción más económica.

Por otro lado, es importante destacar que la comparación de los perfiles obtenidos con otros resultados, también en carne bovina (12-15) (ver tablas 1 y 2), no presentó diferencias estadísticamente significativas, lo que evidencia que los datos obtenidos son coherentes y fiables.

Además, si el valor obtenido en los perfiles hallados presenta mayor o menor similitud con respecto a la literatura, resulta inadecuada la creencia de que a mayor presencia del respectivo ácido graso se presentan mejores resultados. Pues como se evidencia con los resultados, el comportamiento es independiente del resto y, además, la actividad que presenta es diferente con respecto a los reactivos. En este sentido, una de las ventajas destacada de la cromatografía de gases es su utilidad para separar e individualizar cada uno de los componentes, permitiendo su tratamiento como entes independientes el uno del otro.

La comparación de los resultados obtenidos en este estudio con la literatura (tablas 1 y 2) permite establecer que los valores determinados para la mayoría de los ácidos grasos no presentan grandes diferencias comparadas con los resultados reportados para *Longissimus dorsi*. Sin embargo, no se puede generalizar completamente, debido a que no siempre tienen el mismo tipo de dieta. En este sentido, los animales evaluados por Muchenje *et al.*, 2009 (13), fueron de tres razas diferentes (Nguni, Bonsmara y Angus), y para la derivatización utilizó $\text{CH}_3\text{OH} - \text{BF}_3$. Betancour *et al.*, 2009 (14), evaluó los resultados en raza cebú comercial, también con pastoreo como alimentación, y para la derivatización utilizó una solución lista para realizar la metilación

(MethPrepII); Alfaia *et al.*, 2007 (12), trabajó con animales raza Arouqueza y para la derivatización utilizó metóxido de sodio en metanol anhidro; por otro lado, Rule *et al.*, 2002 (15), trabajó con cruces alimentados (pastoreo y de granos) y utilizó para la derivatización $\text{CH}_3\text{OH} - \text{HCL}$ 0.5M. Los ácidos grasos mayoritarios son Oleato (C18:1), Palmitato (C16:0), Estearato (C18:0), Miristato (C14:0), Palmitoleato (C16:1) y Linoleato (C18:2c), en los cuales no se encontraron diferencias significativas ($P > 0,05$) comparadas con los otros trabajos revisados (ver tablas 1 y 2).

Con los resultados de este trabajo, en los que se utilizaron cantidades de 3 y 6 gramos de muestra cárnica, se sugiere utilizar muestras de 4,5 g que lograrían garantizar mayor cantidad de grasa y cuyo perfil lipídico no diferiría del presentado en los 6 gramos; esto debido a que: 1) la grasa total extraída de 3 gramos es limitada para realizar ensayos por triplicado en la fase de derivatización; y 2) no existen diferencias significativas entre ambas metodologías con 3 y 6 g.

Limitaciones

Debido a que la mayoría de trabajos desarrollados anteriormente se realizaron con altas cantidades de muestras y de reactivos, y a que los autores no detallan datos claves de la metodología, tales como pesos de muestra inicial y volúmenes de solvente empleado, se limitan las comparaciones y posibles sugerencias sobre el mejor método de derivatización para caracterizar y cuantificar AG en carne bovina.

CONCLUSIONES

El método de cuantificación de los ésteres metílicos por cromatografía de gases demostró ser muy eficiente y no se encontraron diferencias en los tiempos de retención al utilizar las diferentes metodologías de derivatización. En la etapa de derivatización, al comparar los valores de ésteres metílicos de ácidos grasos expresados en %(p/p) clasificados en saturados, mono-insaturados y poli-insaturados, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para los dos tipos de reactivos utilizados ($\text{CH}_3\text{OH} - \text{CH}_3\text{ONa}$; $\text{CH}_3\text{OH} - \text{BF}_3$) y para los volúmenes de los mismos; por tanto, se puede utilizar cualquiera de las combinaciones propuestas en la etapa de derivatización. Los valores de los ésteres metílicos de los ácidos grasos evaluados en este trabajo presentan valores similares a los reportados en la literatura para ese mismo tipo de posta cárnica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Nelson G, Ackman R. Absorption and transport of fat in mammals with emphasis on n-3 polyunsaturated fatty acids. *Lipids*. 1988; 23 (11): 1005-1014.
2. Kelly L, Ching Kuang C. Fatty Acid Classification and Nomenclature. *Fatty Acids in Foods and their Health Implications*, 3th Ed.: CRC Press; 2007. p. 1-15.
3. Wood JD, Enser M, Fisher AV, Nute GR, Sheard PR, Richardson RI, et al. Fat deposition, fatty acid composition and meat quality: A review. *Meat Sci*. 2008; 78 (4): 343-58.
4. Williams CM. Dietary fatty acids and human health. *Ann Zoo- tech*. 2000; 49 (3): 165-180.
5. Wood JD, Richardson RI, Nute GR, Fisher AV, Campo MM, Kasapidou E, et al. Effects of fatty acids on meat quality: a review. *Meat Sci*. 2004; 66 (1): 21-32.
6. Alfaia CMM, Alves SP, Lopes AF, Fernandes MJE, Costa ASH, Fontes CMGA, et al. Effect of cooking methods on fatty acids, conjugated isomers of linoleic acid and nutritional quality of beef intramuscular fat. *Meat Sci*. 2010; 84 (4): 769-77.
7. David SN, Timothy BJ, Neil K. Principles of Lipid Analysis. Chemical, Biological, and Functional Aspects of Food Lipids, Second Edition: CRC Press; 2010. p. 35-69.
8. búfal Ddlcdágetsdcldvyd, Igor GZ. Acids: Derivatization for GC Analysis. *Encyclopedia of Chromatography*: Taylor & Francis; 2007. p. 3-7.
9. Folch J, Lees M, Stanley GHS. A SIMPLE METHOD FOR THE ISOLATION AND PURIFICATION OF TOTAL LIPIDES FROM ANIMAL TISSUES. *J Biol. Chem* 1957; 226 (1): 497-509.
10. Christie W, Dobson G, Adlof R. A Practical Guide to the Isolation, Analysis and Identification of Conjugated Linoleic Acid. *Lipids*. 2007; 42 (12): 1073-84.
11. Grob RL, Barry EF. *Modern Practice of Gas Chromatography*: Wiley; 2004.
12. Alfaia CPM, Castro MLF, Martins SIV, Portugal APV, Alves SPA, Fontes CMGA, et al. Influence of slaughter season and muscle type on fatty acid composition, conjugated linoleic acid isomeric distribution and nutritional quality of intramuscular fat in Arouquesa-PDO veal. *Meat Sci*. 2007; 76 (4): 787-95.
13. Muchenje V, Hugo A, Dzama K, Chimonyo M, Strydom PE, Raats JG. Cholesterol levels and fatty acid profiles of beef from three cattle breeds raised on natural pasture. *J. Food Comp. Anal*. 2009; 22 (4): 354-358.
14. Betancourt L BCA y DGJ. Determinación de la composición de ácidos grasos en tejidos seleccionados de canales de vacuno y de búfalo. *Livestock Res Rural Dev*; 2009; 21 (3): 43.
15. Rule DC, Broughton KS, Shellito SM, Maiorano G. Comparison of muscle fatty acid profiles and cholesterol concentrations of bison, beef cattle, elk, and chicken. *J Anim Sci*. 2002 May 1; 80 (5): 1202-1211.