

METODOLOGÍA PARA LA EXTRACCIÓN, IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS EN LA DIETA Y LECHE DE CABRAS

MAYRA DENISE HERRERA, MANUEL DE JESÚS FLORES NÁJERA, GERARDO ANTONIO PÁMANES CARRASCO, OLIVIA GABRIELA ROSALES BUGARÍN, JOSÉ ANDRÉS PACHECO GONZÁLEZ



SAGARPA
SECRETARÍA DE AGRICULTURA,
GANADERÍA, DESARROLLO RURAL,
PESCA Y ALIMENTACIÓN



30 inifap
ANIVERSARIO
Líder en ciencia y tecnología para el campo mexicano

Centro de Investigación Regional
Norte Centro
Campo Experimental Zacatecas
Calera de V.R, Zacatecas. Diciembre
2015
Folleto técnico No. 74
ISBN: 978-607-37-0541-7

SECRETARIA DE AGRICULTURA, GANADERÍA, DESARROLLO RURAL,
PESCA Y ALIMENTACIÓN

MTRO. JOSÉ EDUARDO CALZADA ROVIROSA
Secretario

MTRO. JORGE ARMANDO NARVÁEZ NARVÁEZ
Subsecretario de Agricultura

MTRO. RICARDO AGUILAR CASTILLO
Subsecretario de Alimentación y Competitividad

MTRO. HÉCTOR EDUARDO VELASCO MONROY
Subsecretario de Desarrollo Rural

LIC. MARCELO LÓPEZ SÁNCHEZ
Oficial Mayor

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES FORESTALES,
AGRÍCOLAS Y PECUARIAS

DR. LUIS FERNANDO FLORES LUI
Director General

DR. RAÚL GERARDO OBANDO RODRÍGUEZ
Coordinador de Investigación, Innovación y Vinculación

M.C. JORGE FAJARDO GUEL
Coordinador de Planeación y Desarrollo

MTRO. EDUARDO FRANCISCO BERTERAME BARQUÍN
Coordinador de Administración y Sistemas del INIFAP

CENTRO DE INVESTIGACIÓN REGIONAL NORTE CENTRO

DR. HOMERO SALINAS GONZÁLEZ
Director Regional

DR. URIEL FIGUEROA VIRAMONTES
Director de Investigación

DR. FRANCISCO JAVIER PASTOR LÓPEZ
Director de Planeación y Desarrollo

ING. RICARDO CARRILLO MONSIVÁIS
Director de Administración

DR. FRANCISCO GPE. ECHAVARRÍA CHÁIREZ
Director de Coordinación y Vinculación en Zacatecas

METODOLOGÍA PARA LA EXTRACCIÓN, IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS EN LA DIETA Y LECHE DE CABRAS

Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas
y Pecuarias
Progreso No. 5, Barrio de Santa Catarina
Delegación Coyoacán
México, D.F.
C.P. 04010 México, D.F.
Teléfono 01 800 882222

ISBN: 978-607-37-0541-7

Primera Edición: Diciembre 2015

No está permitida la reproducción total o parcial de esta publicación, ni la transmisión de ninguna forma o por cualquier medio, ya sea electrónico, mecánico, fotocopia o por registro u otros métodos, sin el permiso previo y por escrito a la institución.

Cita correcta:

Herrera, M.D.; Flores-Najera, M.J.; Pámanes-Carrasco, G.A.; Rosales-Bugarín, G.O.; Pacheco-González, J.A. 2015. Metodología para la extracción, identificación y cuantificación de ácidos grasos en la dieta y leche de cabras. Folleto Técnico. Núm. 74. Campo Experimental Zacatecas. CIRNOC – INIFAP, 34 páginas.

CONTENIDO

| | |
|--|----|
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| ÁCIDOS GRASOS EN LECHE DE CABRA | 3 |
| ÁCIDOS GRASOS EN LA DIETA | 6 |
| EXTRACCIÓN Y METILACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS EN LA LECHE DE CABRA | 9 |
| Extracción de la grasa de la leche de cabra | 10 |
| Extracción de ácidos grasos de la grasa láctea | 11 |
| Metilación de ácidos grasos | 13 |
| EXTRACCIÓN Y METILACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS EN LA DIETA | 15 |
| Extracción de ácidos grasos de la dieta | 16 |
| Metilación de ácidos grasos | 18 |
| USO DE LA CROMATOGRAFÍA PARA EL ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS | 20 |
| IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS POR MEDIO DE CROMATOGRAFÍA DE GASES | 21 |
| Validación de resultados mediante el uso de estándares comerciales de ácidos grasos | 21 |

| | |
|--|----|
| Separación de ácidos grasos por cromatografía de gases | 24 |
| Obtención de curvas de calibración e identificación de ácidos grasos | 24 |
| CONCLUSIONES | 27 |
| LITERATURA CITADA | 28 |

METODOLOGÍA PARA LA EXTRACCIÓN, IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS EN LA DIETA Y LECHE DE CABRAS

Mayra Denise Herrera¹
Manuel de Jesús Flores-Nájera¹
Gerardo Antonio Pámanes-Carrasco²
Olivia Gabriela Rosales-Bugarín³
José Andrés Pacheco-González³

INTRODUCCIÓN

La composición lipídica es uno de los componentes más importantes de la calidad tecnológica y nutricional de la leche de cabra; los lípidos están implicados en la firmeza y el rendimiento de quesos (por kilogramo de leche), así como en el color y el sabor de los productos lácteos (Chilliard *et al.*, 2003).

De manera específica, la calidad de la leche depende principalmente del perfil de ácidos grasos presentes en la fracción lipídica, ya que este modula las propiedades físicas (incluyendo el punto de fusión, cristalización y fraccionamiento de la grasa) y nutricionales (efectos sobre la salud humana). Adicionalmente, la composición de ácidos grasos también afecta las propiedades organolépticas de la leche y sus derivados (Chilliard *et al.*, 2000).

¹ Investigadores de los Programas de Frijol y Garbanzo y Carne de Rumiantes del Campo Experimental Zacatecas, respectivamente.

² Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Juárez del Estado de Durango.

³ Tesistas de la Universidad Politécnica de Zacatecas.

Debido a lo anterior, el interés por modificar la composición de ácidos grasos ha crecido en las últimas décadas, es decir, la investigación en el ganado lechero se ha centrado en la evaluación de los factores que pueden causar cambios en la grasa láctea y sus componentes (Pinelli *et al.*, 2012). En este sentido, existen diferentes factores, intrínsecos y extrínsecos, que están ligados a la modificación del perfil de ácidos grasos. Entre los factores extrínsecos, uno de los más importantes es la composición de la dieta, ya que la dieta juega un papel importante en la modulación de dichos compuestos en la leche producida por cualquier rumiante (Addis *et al.*, 2005; Chilliard *et al.*, 2004). Es decir, el consumo de forrajes frescos por medio del pastoreo o las dietas compuestas por forrajes secos suplementados con concentrados, tienen un efecto importante en la composición de la grasa láctea (Addis *et al.*, 2005).

La determinación de ácidos grasos libres en forrajes, leche y productos derivados consiste en la extracción de lípidos, el aislamiento de los ácidos grasos libres, así como la identificación y cuantificación por medio de la cromatografía. Sin embargo, la recuperación cuantitativa de cada ácido graso depende en gran medida del método utilizado para aislarlos de la muestra, y el procedimiento es generalmente complicado (González-Córdova y Vallejo-Cordoba, 2001).

Bajo este contexto, en el laboratorio de alimentos del INIFAP-Zacatecas se han estandarizado las técnicas de extracción, identificación y cuantificación de ácidos grasos en muestras líquidas (leche) y sólidas (alimento), así como la metilación y esterificación de los mismos.

ÁCIDOS GRASOS EN LA LECHE DE CABRA

La composición de ácidos grasos en la leche es muy compleja, no solo por la longitud de la cadena hidrocarbonada (compuesta por una estructura que va desde 4 hasta 26 carbonos, incluyendo las cadenas ramificadas y la presencia de dobles y triples enlaces entre átomos de carbono) sino que además, la leche contiene isómeros posicionales y geométricos de ácidos grasos insaturados, encontrándose en muy bajas concentraciones (Kramer *et al.*, 1997).

El perfil lipídico, en particular de los ácidos grasos libres, son los responsables del sabor y aroma de la leche. Según Haenlein *et al.* (2004), la leche de cabra tiene altas concentraciones de ácido butírico (C4:0), caproico (C6:0), caprílico (C8:0), cáprico (C10:0), láurico (C12:0), mirístico (C14:0), palmítico (C16:0) y linoleico (C18:2), sin embargo, presenta bajo contenido de ácido esteárico (C18:0) y oleico (C18:1). En comparación con la leche de vaca, la leche de cabra contiene altos niveles de ácidos grasos de cadena

media, y algunos de estos han sido nombrados por su presencia en la leche de esta especie rumiante (caproico, caprílico y cáprico).

El contenido y composición de la grasa de la leche de cabra difiere significativamente a la grasa láctea de vaca; la presencia de niveles relativamente altos de ácidos grasos de cadena media (C6:0-C10:0) en la leche de cabra es superior, y pudiera ser responsable de su sabor fuerte y de menor aceptación (Kompan y Komprej, 2012), sin embargo, algunos autores han mencionado que esto no es necesariamente desfavorable, ya que la elevada concentración de estos ácidos grasos le confiere un alto interés como materia prima en la elaboración de otros alimentos, principalmente quesos (Chilliard *et al.*, 2003), además, la digestión de la grasa contenida en la leche de cabra es mayor por su amplia proporción de ácidos grasos de cadena corta y media, en comparación a la grasa presente en la leche de vaca (Bernard *et al.*, 2009).

Además de su contribución a la calidad de los derivados lácteos, los diferentes ácidos grasos (de cadena corta y media, saturados y ramificados, mono y poliinsaturados, cis y trans, y conjugados) están potencialmente implicados, positivamente, en la salud de los consumidores. En este sentido, por su alto contenido de ácidos grasos de cadena media, la leche de cabra se han establecido

como tratamientos médicos para una amplia serie de trastornos clínicos (Chilliard *et al.*, 2003; Haenlein *et al.*, 2004).

Debido a la capacidad metabólica para proporcionar energía directa en lugar de depositarse en el tejido adiposo, y a su capacidad para reducir los niveles de colesterol en suero (inhibiendo y limitando la deposición del colesterol) le leche de cabra se ha recomendado como tratamiento contra diferentes padecimientos, incluyendo los síndromes de malabsorción, esteatorrea, hiperlipoproteinemia, quiluria, resección intestinal, desnutrición infantil, fibrosis quística y cálculos biliares (LeDoux *et al.*, 2002).

Por otro lado, según Kramer *et al.* (2002), el análisis de la grasa láctea de animales rumiantes ha tomado una nueva importancia desde la identificación del ácido linoleico conjugado (CLA, por sus siglas en inglés), ya que este compuesto posee propiedades anti-obesogénicas (Park *et al.*, 1997), modula el sistema inmune (Cook *et al.*, 1993), reduce la aterosclerosis (Nicolosi *et al.*, 1997) y presenta propiedades biológicas contra la diabetes tipo 2 (Houseknecht *et al.*, 1998); además de poseer propiedades anti-carcinogénicas (Kompan *et al.*, 2012) inhibiendo la proliferación de cáncer en colon, seno y pulmón (Parodi, 1997).

Por lo anterior, el uso de una metodología estandarizada para la identificación y cuantificación de los ácidos grasos presentes en la leche de cabra es de gran importancia para conocer tanto su calidad organoléptica como nutracéutica.

ÁCIDOS GRASOS EN LA DIETA

Según Nudda *et al.* (2003) y Bernard *et al.* (2009), la nutrición del animal (relación forraje-concentrado, el tipo de forraje, etc.) es el principal factor ambiental que regula la síntesis de grasa en la leche y la composición de ácidos grasos de la misma. En consecuencia, se ha reconocido que la dieta juega un papel importante en la modulación de la composición de ácidos grasos de la leche de ganado vacuno (Jensen, 2002), caprino (Kompan y Komprej, 2012) y ovino (Addis *et al.*, 2005).

Estudios recientes han demostrado que la composición de ácidos grasos de especies forrajeras es modulada por factores tales como el tipo de cultivo, la etapa de madurez, la intensidad de defoliación, el intervalo de tiempo entre el corte y su consumo, y las técnicas de conservación del forraje. Por lo tanto, la amplia gama de ácidos grasos en la composición lipídica de los forrajes frescos, su variabilidad durante el ciclo del cultivo y los cambios posteriores al corte o pastoreo pueden afectar la disponibilidad de estos compuestos en la grasa láctea (Addis *et al.*, 2005).

A pesar de que los forrajes contienen pequeñas cantidades de lípidos, son una fuente importante de ácidos grasos para el ganado lechero. Los forrajes contienen altas concentraciones de ácido oleico, palmítico, linoleico y linolénico (Elgersma *et al.*, 2003).

Por otro lado, el contenido de lípidos del forraje está influenciado por la proporción del tejido foliar en la planta, el cual se verá afectada por la especie de la planta, la madurez, las condiciones ambientales y las prácticas agrícolas (como el uso de fertilizantes). Por lo tanto, la cantidad de lípidos y los ácidos grasos específicos disponibles para el ganado dependerá de la cantidad de tejido de hoja consumida. (Dewhurst *et al.*, 2001; Mir *et al.*, 2006).

En un estudio realizado en cabras alimentadas con diferentes tipos de forrajes, se encontró que los cambios en la composición de ácidos grasos de leche eran dependientes del tipo de forraje y la composición lipídica del mismo, con la evidencia de una interacción entre estos factores. En este estudio, la respuesta a la ingesta de plantas con alta concentración de lípidos se caracterizó por una reducción en la *síntesis de novo* de los ácidos grasos (C10:0-C16:0) y un aumento en las concentraciones de C18:0, cis-C18:1, y CLA (Bernard *et al.*, 2009).

De acuerdo con LeDous *et al.* (2002), la grasa láctea de cabras alimentadas con altas cantidades de forrajes tiene mayor concentración de C4:0, C6:0, C18:0, C18:1, C18:3 y C20:0. No obstante, cuando los animales son alimentados con dietas con bajo contenido de forrajes, la síntesis de C10:0, C12:0, C14:0, C16:0 y C18:2 en la fracción lipídica de la leche es mayor.

En conclusión, la dieta constituye una forma natural y económica para modular la composición de ácidos grasos en la leche de cabra; sin embargo, antes de realizar la recomendación de modificar la dieta en la producción de leche, con el fin de modificar el perfil de ácidos grasos, es importante comprobar que tales prácticas no perjudicarán la calidad de la leche y sus derivados (Chilliard *et al.*, 2004). Adicionalmente, es importante considerar que las variaciones en el contenido de ácidos grasos disponibles en el alimento causarán variaciones en el contenido de lípidos que se acumulan en los tejidos de los rumiantes (Mir *et al.*, 2006).

Bajo el contexto anterior, el conocimiento respecto a la influencia que tiene el perfil de ácidos grasos de la dieta sobre la composición de ácidos grasos y CLA en la leche de cabras es muy limitado, lo que denota la importancia de analizar el material vegetal utilizado en la alimentación de estos animales.

EXTRACCIÓN Y METILACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS EN LA LECHE DE CABRA

La preparación de soluciones (reactivos y concentración final) para la extracción y metilación de ácidos grasos, en muestras de leche de cabra, se expresa en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Componentes y concentración de soluciones para extracción y metilación de muestras de leche.

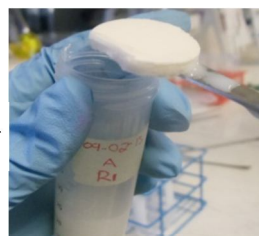
| Solución | Reactivos | Concentración |
|-------------------------|---------------------------------|--|
| Extracción | | |
| Hexano:isopropanol | Hexano Isopropanol | 3:2 v/v |
| Sulfato de sodio | Sulfato de sodio Agua | 67% en agua |
| Metilación | | |
| Acetato de metilo | Acetato de metilo | Concentrado |
| Reactivo de metilación | Metanol Metóxido de sodio | 1.75:0.4 v/v nota: [metóxido de sodio]= 5.4 M |
| Reactivo de terminación | Ácido oxálico Éter dietílico | 33.4% en éter dietílico |

La concentración de las soluciones expresada en porcentaje es en base a un litro de solución.

Extracción de la grasa de la leche de cabra. La extracción de la grasa láctea se realizó por el método propuesto por Luna *et al.* (2005), que consistió en centrifugar 30 mL de leche a 1000 g durante 20 min. La grasa fue removida con una espátula y fue colocada en tubos cónicos de 50 mL con taparrosca, previamente rotulados y pesados. Los tubos con la muestra fueron pesados nuevamente para conocer, por diferencia de pesos, la cantidad exacta de grasa láctea colocada (Figura 1).



Centrifugar leche
3000 RPM 20 min



Obtención de la
grasa láctea

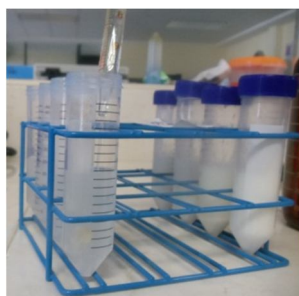


Colocar la grasa láctea en
tubos pesados y rotulados

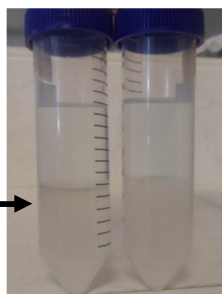


Figura 1. Extracción de grasa de la leche de cabra.

Extracción de ácidos grasos de la grasa láctea. La extracción de ácidos grasos de la grasa láctea se realizó siguiendo el método propuesto por Hara y Radin (1978), que consistió en usar una solución de hexano:isopropanol (Cuadro 1) a razón de 18 mL/g de grasa, seguido de una solución de sulfato de sodio (Cuadro 1) a una proporción de 12 mL/g de grasa. Después de agregar la mezcla de solventes en la proporción correspondiente al peso de la muestra, se dejó reposar por espacio de 2 h para alcanzar su completa disolución. Los ácidos grasos disueltos en hexano (sobrenadante) fueron removidos con una pipeta Pasteur y colocados en un nuevo tubo previamente pesado y rotulado. Los ácidos grasos se recuperaron evaporando el hexano por medio de un baño de agua a 80°C. Una vez evaporado el hexano se pesaron nuevamente los tubos en una balanza analítica y por diferencia de peso se obtuvo el peso de los ácidos grasos (Figura 2).



Adición de Hexano:Isopropanol 3:2 v/v
y Sulfato de sodio al 67%



Dejar reposar por 2 h

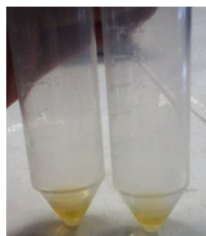


Sistema de extracción

Los ácidos grasos
libres se encuentran
disueltos en la fase
superior del sistema



Evaporación de la fase superior



Obtención de ácidos
grasos libres

Figura 2. Extracción de ácidos grasos de la grasa láctea.

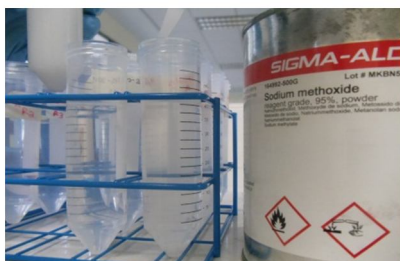
Metilación de ácidos grasos. La metilación de los ácidos grasos se llevó a cabo por el método propuesto por Christie (1982), tomando en cuenta las modificaciones realizadas por Chouinard *et al.* (1999). Por cada 40 mg de ácidos grasos se agregaron 40 μL de acetato de metilo concentrado. La mezcla se agitó usando un agitador mecánico (vortex). Posteriormente, se adicionaron 40 μL de reactivo de metilación que consiste en la mezcla de una solución de metóxido de sodio y metanol (Cuadro 1). Se agitó nuevamente y la solución se dejó reposar durante 10 min. Por último, se adicionaron 60 μL del reactivo de terminación (ácido oxálico disuelto en éter dietílico). Después de agregar la fase de terminación, los tubos fueron centrifugados a 4000 g durante 5 min a 5°C. Los ácidos grasos metil-esterados disueltos en hexano (sobrenadante) fueron removidos con una pipeta Pasteur de vidrio. Finalmente se realizó la evaporación del solvente orgánico por medio de rotaevaporación. Los ácidos grasos fueron almacenados a 80 °C hasta su análisis (Figura 3).



Agregar acetato de metilo



Agitar en el vortex



Agregar reactivo de metilación



Dejar en reposo por 10 min

Ácidos grasos disueltos en hexano



Agregar reactivo de terminación, recuperar fase superior y rotaevaporar

Figura 3. Metilación de ácidos grasos de la grasa láctea.

EXTRACCIÓN Y METILACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS EN LA DIETA

La preparación de soluciones (reactivos y concentración final) para la extracción y metilación de ácidos grasos, en la dieta de cabras, se expresa en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Componentes y concentración de soluciones para extracción y metilación de muestras de alimento.

| Solución | Reactivos | Concentración |
|-----------------------------|-------------------------------|------------------|
| Extracción | | |
| Cloroformo:metanol | Cloroformo Metanol | 2:1 v/v |
| Cloruro de potasio | Cloruro de potasio Metanol | 0.88% en metanol |
| Solución de solventes puros | Cloroformo Metanol Agua | 8:4:3 v/v/v |
| Metilación | | |
| Hidróxido de sodio | Hidróxido de sodio Metanol | 1% en metanol |
| Trifluoruro de boro | Trifluoruro de boro | Concentrado |

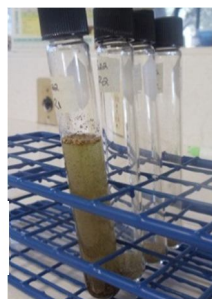
La concentración de las soluciones expresada en porcentaje es en base a un litro de solución.

Extracción de ácidos grasos de la dieta. La determinación y cuantificación de ácidos grasos del alimento, se llevó a cabo de acuerdo a la metodología propuesta por Folch *et al.* (1957) (Figura 4). Se utilizó 1 g de alimento, posteriormente se adicionó 20 mL de una solución de cloroformo-metanol. Se filtró la muestra y el filtrado fue denominado "extracto crudo". Posteriormente, se realizó un lavado del extracto crudo con la adición de 0.2 veces su volumen de cloruro de potasio lo que permitió la separación de fases.

Se retiró y desechó la máxima cantidad posible de la fase superior; la fase inferior se lavó con 0.15 volúmenes de una solución de solventes puros vertiéndose a través de las paredes del tubo y mezclando por inversión lenta. Este lavado se repitió 2 veces. Posteriormente, se aforó al volumen inicial del extracto con solución de cloroformo-metanol (Cuadro 2). Finalmente, se evaporó el cloroformo en baño de agua a 80°C.



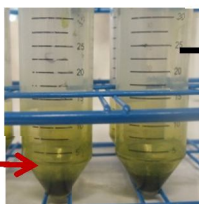
Tomar 1 g de alimento



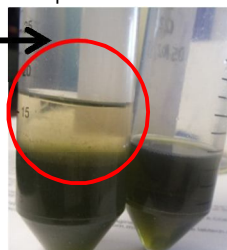
Disolver en 20 mL de Cloroformo.MtOH 2:1 v/v



Filtrar la muestra



Extracto crudo

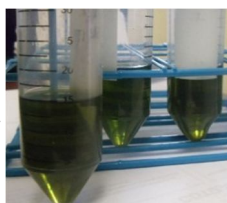


Lavado con cloruro de potasio 0.88%

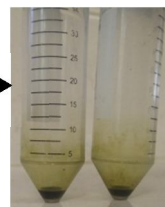
Eliminar fase superior



Lavados con solución de solventes puros



Aforar el extracto crudo, Posteriormente evaporar cloroformo



Obtención de ácidos grasos libres

Figura 4. Extracción de ácidos grasos de la dieta.

Metilación de ácidos grasos. La metilación se realizó conforme a lo propuesto por el método 969.33 de la AOAC. Por cada g de grasa se adicionaron 3 mL de NaOH en metanol. Posteriormente, se colocó en un baño de agua a 80°C durante 60 min. Transcurrido este tiempo, se agregó 2 mL de trifluoruro de boro en metanol (Cuadro 2) para incubar a 80 °C durante 15 min; en seguida, se agregó 3 mL de hexano grado HPLC y se agitó durante 1 min. El siguiente paso fue centrifugar la muestra a 1000 g durante 10 min para recuperar el sobrenadante y repetir el proceso a partir de la incubación; los sobrenadantes colectados se aforaron a un volumen de 10 mL con hexano. Esta fracción se consideró la fracción de los ácidos grasos metil-esterados, la cual se preservó en ultra-congelación a -80 °C para su análisis posterior.

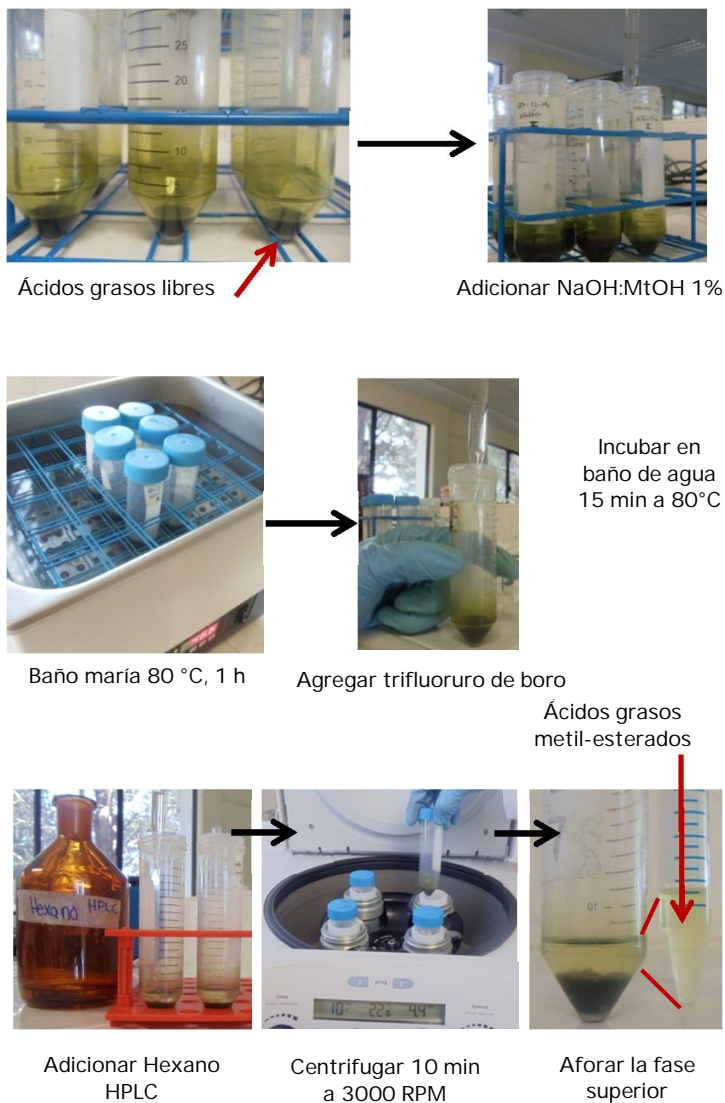


Figura 5. Metilación de ácidos grasos de la dieta.

USO DE LA CROMATOGRAFÍA PARA ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS

La cromatografía ha sido una herramienta poderosa para en el análisis de ácidos grasos; no obstante, existe una amplia gama de técnicas que han sido publicadas desde los años 50. Algunas de estas son la cromatografía en fase reversa líquido-líquido (Howard y Martin, 1950), la utilización de la cromatografía gas-líquido (James y Martin, 1956), la cuantificación de ácido grasos de cadena larga en materiales biológicos utilizando la cromatografía capilar de gases (Muskiel, 1983), el análisis de ácidos grasos metil-esterados por medio de la cromatografía de gases (Badings y Jong, 1983), cromatografía de gases acoplado a espectrofotometría de masas (Alonso *et al.*, 1999), y la evaluación de ácidos grasos metilados por medio de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), propuesta por Kramer *et al.* (1997).

De todos los anteriores, la cromatografía de gases es el método más utilizado para evaluar el perfil de ácidos grasos en muestras de grasas y aceites. Este análisis no es posible sin llevar a cabo la metil-esterificación de los ácidos grasos libres de manera previa. En este sentido, es importante que ninguno de los pasos en la secuencia de operación afecte los resultados cualitativos y cuantitativos, por lo que se recomienda estandarizar el método de

separación considerando el tipo de columna y el tipo de compuesto(s) que se desea analizar (Kramer *et al.*, 2002; Badings y Jong, 1983).

IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS POR MEDIO DE CROMATOGRAFÍA DE GASES

La evaluación del perfil de ácidos grasos se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases de la marca Perkin Elmer modelo Clarus 500 con columna capilar Supelcowax™10 (Supelco) de 30 metros de longitud por 0.20 mm de diámetro interno y 0.25 µm de espesor y se utilizó helio como gas de acarreo.

La identificación de ácidos grasos se realizó en base a las curvas de calibración y el tiempo de retención de estándares individuales de ácidos grasos (Sigma-Aldrich, St Louis, USA). En el Cuadro 3 se indica los ácidos grasos a identificar con el método montado en el laboratorio de alimentos del Campo Experimental Zacatecas y sus respectivos tiempos de retención.

Validación de resultados mediante el uso de estándares comerciales de ácidos grasos. Se realizó previo a la corrida de los estándares en el cromatógrafo de gases. Se tomó 100 mg del estándar y se colocó en un tubo cónico de 50 mL, en seguida se adicionó 10 mL de Metanol-HCl 1N. La mezcla se incubó en baño de agua a 70 °C durante 2 h con la taparrosca semi-cerrada,

durante este periodo se agitó la mezcla en un agitador mecánico (vortex) cada 30 min cerrando completamente la taparroca para evitar derrames. Al término de la incubación, se dejó enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregaron 4 mL de hexano y se centrifugó a 2800 g durante 5 min. Finalmente, se recuperó la fase orgánica (sobrenadante) con una pipeta Pasteur de vidrio; la fase orgánica recuperada se aforó a 10 mL con hexano.

Cuadro 3. Ácidos grasos y tiempos de retención (TR, min).

| Nomenclatura IUPAC | Ácido graso | | TR |
|------------------------|--------------------|--------------------------------|-------|
| | Número de carbonos | Nombre común | |
| Hexanoico | C6:0 | Ácido Caproico | 2.69 |
| Octanoico | C8:0 | Ácido Caprílico | 3.00 |
| Decanoico | C10:0 | Ácido Cáprico | 3.35 |
| Docecanoico | C12:0 | Ácido Laurico | 3.66 |
| Tetradecanoico | C14:0 | Ácido Mirístico | 5.25 |
| 9-cis-tetradecanoico | C14:1 | Ácido Miristoleico | 5.39 |
| Hexadecanoico | C16:0 | Ácido Palmítico | 8.38 |
| 9-cis-hexadecenoico | C16:1 | Ácido Palmitoleico | 8.70 |
| Heptadecanoico | C17:0 | Ácido Margárico | 8.35 |
| Octadecanoico | C18:0 | Ácido Estearico | 10.30 |
| 9-cis-octadecenoico | C18:1 | Ácido Oleico | 12.60 |
| Octadecadienoico | C18:2 | Ácido Linoleico | 14.02 |
| Octadecatrienoico | C18:3 | Ácido Linolénico | 15.70 |
| Nonadecanoico | C19:0 | Ácido Nonadecílico | 12.09 |
| 11-trans-octadecenoico | | Ácido trans-vaccenico | 11.1 |
| Isómeros de CLA | | | |
| 9,11 octadecadienoico | | CLA cis-9, trans-11 (ruménico) | 16.50 |
| 10,12 octadecadienoico | | CLA trans-10, cis-12 | 13.53 |

TR, tiempo de retención; CLA, ácido linoleico conjugado

Separación de ácidos grasos por cromatografía de gases. La separación de los ácidos grasos de las muestras, así como la detección de los estándares comerciales se realizó mediante la programación de una serie de rampas de temperatura (Pinelli *et al.*, 2012).

La temperatura inicial fue de 50 °C y se mantuvo constante durante 1 min, después se incrementó a razón de 10 °C/min hasta llegar a 166 °C. Posteriormente se llevó a cabo un nuevo incremento con una rampa de 1 °C/min hasta alcanzar 174 °C. La siguiente rampa de temperatura fue de 2 °C/min hasta los 194 °C. La última rampa fue con incrementos de 3.5 °C/min hasta llegar a los 215 °C, una vez alcanzada esta temperatura se mantuvo constante durante 6 min. El tiempo total de la corrida fue de 30 min. Para correr las muestras de ácidos grasos en leche, se tomó 50 mg de ácidos grasos metilados y se diluyeron en 2 mL de hexano.

Obtención de curvas de calibración e identificación de ácidos grasos. Para obtener las curvas de calibración, fue necesario considerar la concentración del estándar metilado, a partir de éste, realizar las diluciones que conformaron los diferentes puntos de la recta. El objetivo fue obtener un modelo de regresión lineal entre la concentración del ácido graso y la señal obtenida en el detector del cromatógrafo (FID), representada

como el área bajo la curva en los cromatogramas, y cuantificar las concentraciones basados en el área bajo la curva de las muestras; en la Figura 6 se muestra la curva de calibración del CLA cis-9, trans-11, cuyo TR es 16.50 min (Cuadro 3). Este procedimiento se repitió para cada estándar de ácido graso de manera individual.

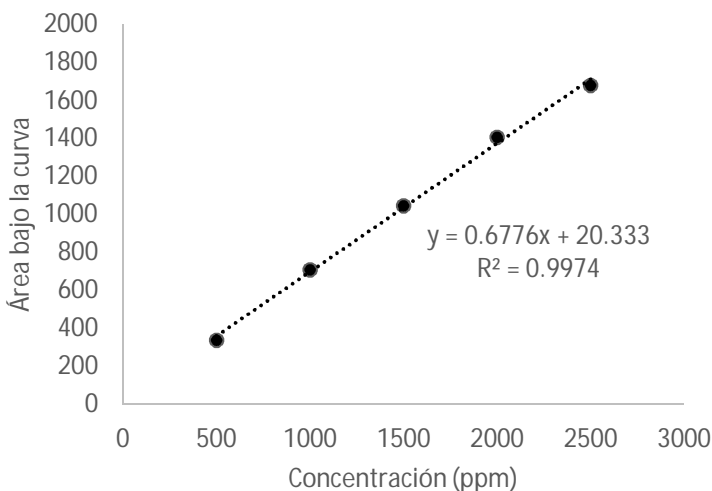


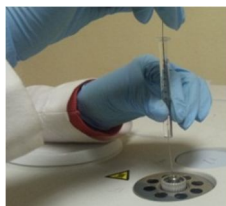
Figura 6. Curva de calibración del CLA cis-9, trans-11.

Después de obtener las curvas de calibración de los estándares, se realizó la corrida de las muestras en el cromatógrafo de gases (Figura 7). La identificación de los ácidos grasos en las muestras a analizar se llevó a cabo mediante la comparación del TR de cada pico obtenido, con el TR de cada estándar. Mediante la integración del área de cada pico identificado, se lleva a cabo una sustitución

en la ecuación de la recta de la curva de calibración de cada ácido graso identificado, para conocer la concentración de ese ácido graso en el volumen inyectado en el cromatógrafo de gases.



Preparar muestra para inyección en el cromatógrafo de gases



Inyectar muestra



Separación de ácidos grasos por medio del cromatógrafo de gases



CROMATOGRAMA

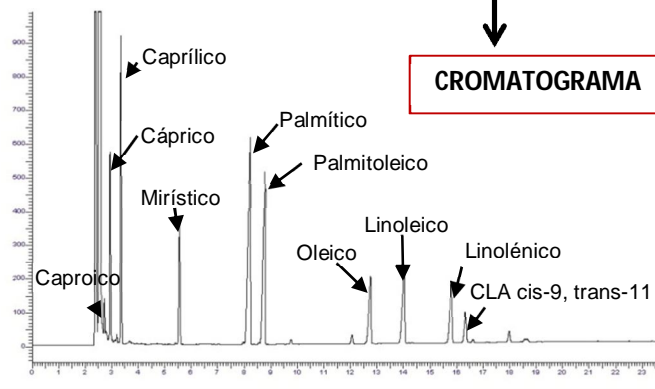


Figura 7. Separación de ácidos grasos por cromatografía de gases.

CONCLUSIÓN

El rendimiento de ácidos grasos recuperados en la muestra depende ampliamente del método utilizado en su extracción, por lo tanto, la estandarización de los métodos de extracción y metilación de los ácidos grasos presentes en muestras líquidas y sólidas (leche y dieta) es importante para su correcta identificación y cuantificación.

A partir de los datos obtenidos por cromatografía de gases (tiempo de retención de cada estándar y el área bajo la curva de cada punto de la gráfica), es posible construir curvas de calibración que permitirán una cuantificación más precisa de los ácidos grasos presentes en muestras de leche y en la dieta de cabras.

LITERATURA CITADA

- Addis M.; Cabiddu A.; Pinna G.; Decandia M.; Pirreda G.; Pirisi A.; Molle G. 2005. Milk and cheese fatty acids composition in sheep fed mediterranean forages with reference to conjugated linoleic acid cis-9-trans-11. *Journal of Dairy Science*. 12: 3443-3453.
- Alonsos, L.; Fontecha, J.; Lozada, L.; Fraga, M.J.; Juárez, M. 1999. Fatty acid composition of caprine milk: major, branched-chain, and trans fatty acids. *Journal of Dairy Science*. 82: 878-884.
- [AOAC] Association of Official Analytical Chemists (2000). *Official methods of analysis*. Washington, DC.: AOAC.
- Badings, H.T.; Jong, C.D. 1983. Glass capillary gas chromatography of fatty acid methyl esters. A study of conditions for the quantitative analysis of short- and long-chain fatty acids in lipids. *Journal of Chromatography A*. 279: 493-506.
- Bernard, L.; Shingfield, K.J.; Rouel, J.; Ferlay, A.; Chilliard, Y. 2009. Effect of plant oils in the diet on performance and milk fatty acid composition in goats fed diets based on grass

hay or maize silage. *British Journal of Nutrition*. 101: 213-224.

Chilliard, Y.; Ferlay, A. 2004. Dietary lipids and forages interactions on cow and goat milk fatty acid composition and sensory properties. *Reproduction Nutrition Developments*. 44: 467-492.

Chilliard, Y.; Ferlay, A.; Mansbridge, R.; Doreau, M. 2000. Ruminant milk fat plasticity: nutritional control of saturated, polyunsaturated, trans and conjugated fatty acids. *Annales de Zootechnie*. 49: 181-205.

Chilliard, Y.; Ferlay, A.; Rouel, J.; Lamberet, G. 2003. A review of nutritional and physiological factors affecting goat milk lipid synthesis and lipolysis. *Journal of Dairy Science*. 86: 1751-1770.

Chouinard, PY.; Corneau, L.; Sæbø, A.; Bauman, DE. (1999). Milk yield and composition during abomasal infusion of conjugated linoleic acids in dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 82:2737–2745.

- Christie, W.W. (1982). A simple procedure for rapid transmethylation of glycerolipids and cholesterol esters. *Journal of Lipid Research*. 23:1072–1075.
- Cook, M. E.; Miller, C. C.; Park, Y.; Pariza, M. 1993 Immune modulation by altered nutrient metabolism: nutritional control of immune-induced growth depression. *Poultry Science* 72: 1301–1305.
- Dewhursts, R.J.; Scollan, N.D.; Youell, S.J.; Tweed, J.K.S.; Humphreys, M.O. 2001. Influence of species, cutting date and cutting interval on the fatty acid composition of grasses. *Grass and Forage Science*. 56: 68-74.
- Elgersma, A.; Ellen, G.; Horst, H.; Muuse, B.G.; Boer, H.; Tamminfa, S. Influence of cultivar and cutting date on the fatty acid composition of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Grass and Forage Science*. 58:323-331.
- Folch, J.; Lees, M; Sloane-Stanley, GH. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226:497-509.

- González-Córdova, A.F.; Vallejo-Cordoba, B. 2001. Quantitative determination of short-chain free fatty acids in milk using solid-phase microextraction and gas chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49: 4603-4608.
- Hara, A.; Radin, NS. (1978). Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. *Analytical Biochemistry*. 90:420–426.
- Haenlein, G.F.W. 2004. Goat milk in human nutrition. *Small Ruminant Research*. 51: 155-163.
- Houseknecht, K.L.; Vanden Heuvel, J.P.; Moya-Camarena, S.Y.; Portocarrero, C.P.; Peck, L.W.; Nickel, K.P.; Belury, M.A. 1998. Dietary conjugated linoleic acid normalizes impaired glucose tolerance in the Zucker diabetic fatty fa/fa rat. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 244: 678–682.
- Howard, G.A; Martin, A.J.P. 1950. The separation of the C₁₂-C₁₈ fatty acids by reversed-phase partition chromatography. *Biochemical Journal*. 46: 532-538.
- James, A.T.; Martin, A.J.P. 1956. *Gas-Liquid Chromatography: the Separation and Identification of the Methyl Esters of*

Saturated and Unsaturated Acids from Formic Acid to n-Octadecanoic Acid. *Biochemical Journal*. 63: 144-152.

Kramer, J.K.G; Blackadar, B.C.; Zhou, J. 2002. Evaluation of two GC columns (60-m SUPELCOWAX 10 and 100-m CP Sil 88) for analysis of milkfat with emphasis on CLA, 18:1, 18:2 and 18:3 isomers, and short- and long-chain FA. *Lipids*. 37: 823-835.

Kramer, JK.G; Fellner, V.; Dugan, M.E.R; Sauer, F.D.; Mossaba, M.M.; Yurawecz, M.P. 1997. Evaluating Acid and Base Catalysts in the Methylation of Milk and Rumen Fatty Acids with Special Emphasis on Conjugated Dienes and Total *trans* Fatty Acids. *Lipids*. 32:1219-1228.

Kompan, D.; Komprej, A. 2012. The effect of fatty acids in goat milk on health. in: N. Chaiyabutr (Ed.), *Milk Production: an up-to-date overview of animal nutrition, management and health*. INTECH, pp. 3-28.

LeDoux, M.; Rouzeau, A.; Bas, P.; Sauvant, D. 2002. Occurrence of *trans*-C18:1 fatty acid isomers in goat milk: effect of two dietary regimens. *Journal of Dairy Science*. 85: 190–197.

- Luna, P.; Juárez, M.; De la Fuente, M.A. 2005. Validation of a rapid milk fat separation method to determine the fatty acid profile by gas chromatography. *Journal of Dairy Science*. 88:3377–3381.
- Mir, P.S.; Bittman, S.; Hunt, D.; Entz, T.; Yip, B. 2006. Lipid content and fatty acid composition of grasses sampled on different dates through the early part of the growing season. *Canadian Journal of Animal Science*. 86:279-290
- Muskiet, F.A.J. 1983. Capillary gas chromatographic profiling of total long-chain fatty acids and cholesterol in biological materials. *Journal of Chromatography*. 278:231-244.
- Nicolosi, R. J.; Rogers, E. J.; Kritchevski, D.; Scimeca, J. A.; Huth, P. J. 1997. Dietary conjugated linoleic acid reduces plasma lipoproteins and early aortic atherogenesis in hypercholesterolemic hamsters. *Artery*. 22: 266–277.
- Nudda, A.; Mele, M.; Battacone, G.; Usai, M.G.; Macciotta, N.P.P. 2003. Comparison of conjugated linoleic acid (CLA) content in milk of ewes and goats with the same dietary regimen. *Italian Journal of Animal Science*. 2: 515-517

- Park, Y.; Albright, K. J.; Liu, W.; Storkson, J.M.; Cook, M.E.; Pariza, M.W. 1997. Effect of conjugated linoleic acid on body composition in mice. *Lipids*. 32: 853–858.
- Parodi, P.W.F. 1997. Cow's milk fat components as potential anticancerogenic agents. *Journal of Nutrition*, 127: 1055-1060.
- Pinelli-Saavedra, A.; Martínez-Borraz, A.; Moya-Camarena, S.Y.; González-Ríos, H.; Hernández, J. 2012. Fatty acid profile and conjugated linoleic acid content of milk from confined Holstein cows during the summer and winter season, in: N. Chaiyabutr (Ed.), *Milk Production: an up-to-date overview of animal nutrition, management and health*. INTECH, pp. 103-120.

AGRADECIMIENTOS

Este folleto se publicó con apoyo financiero de fondos fiscales del INIFAP dentro del proyecto "Contenido de ácidos grasos en la dieta y leche de cabras en pastoreo y su efecto sobre las características fisicoquímicas y organolépticas de la leche".

REVISIÓN TÉCNICA Y EDICIÓN

Dra. Raquel Karina Cruz Bravo
INIFAP Zacatecas

Dr. Francisco Javier Pastor López
INIFAP La Laguna

DISEÑO DE PORTADA

MC. Mayra Denise Herrera

Grupo Colegiado del CEZAC

Presidente: Dr. Jaime Mena Covarrubias
Secretario: Dr. Francisco G. Echavarría Cháirez
Comisión Editorial y Vocal: Dr. Manuel de J. Flores Nájera
Vocal: Dr. Guillermo Medina García
Vocal: Dr. Luis Roberto Reveles Torres
Vocal: Dr. Jorge A. Zegbe Domínguez
Vocal: MC. Mayra Denise Herrera

La presente publicación se terminó de imprimir en el mes de
Diciembre de 2015 en "Paus" Impresiones, Calle Real del Calvario
#125, Col. Real de Calera. C. P. 98500,
Calera de V. R., Zacatecas, México.
Tel. (478) 98 5 22 13

Su tiraje constó de 500 ejemplares

CAMPO EXPERIMENTAL ZACATECAS

DIRECTORIO

Dr. Francisco Gpe. Echavarría Cháirez Director de Coordinación y Vinculación

PERSONAL INVESTIGADOR

| | | |
|------|-------------------------------|--|
| Dr. | Guillermo Medina García | Agrometeorología y Modelaje |
| MC. | Nadiezhdá Y. Ramírez Cabral* | Agrometeorología y Modelaje |
| Dr. | Manuel de Jesús Flores Nájera | Carne de Rumiantes |
| Dr. | Alfonso Serna Pérez | Fertilidad de suelos y nutrición vegetal |
| Ing. | José Ángel Cid Ríos | Frijol y Garbanzo |
| MC. | Mayra Denise Herrera | Frijol y Garbanzo |
| MC. | Juan José Figueroa González | Frijol y Garbanzo |
| Dr. | Jorge A. Zegbe Domínguez | Frutales |
| MC. | Valentín Melero Meraz | Frutales |
| Ing. | Manuel Reveles Hernández | Hortalizas |
| MC. | Miguel Servin Palestina | Ingeniería de Riego |
| Dra. | Raquel K. Cruz Bravo | Inocuidad de Alimentos |
| MC. | Enrique Medina Martínez | Maíz |
| MC. | Francisco A. Rubio Aguirre | Pastizales y Cultivos Forrajeros |
| Dr. | Ramón Gutiérrez Luna | Pastizales y Cultivos Forrajeros |
| Ing. | Ricardo A. Sánchez Gutiérrez* | Pastizales y Cultivos Forrajeros |
| Dr. | Luis Roberto Reveles Torres | Recursos Genéticos: Forestales, Agrícolas, Pecuarios y Microbianos |
| Dr. | Jaime Mena Covarrubias | Sanidad Forestal y Agrícola |
| Dr. | Rodolfo Velásquez Valle | Sanidad Forestal y Agrícola |
| MC. | Blanca I. Sánchez Toledano* | Socioeconomía |

*Becarios

WWW.INIFAP.GOB.MX

SAGARPA

SECRETARÍA DE AGRICULTURA,
GANADERÍA, DESARROLLO RURAL,
PESCA Y ALIMENTACIÓN



30 **inifap**
ANIVERSARIO

Líder en ciencia y tecnología para el campo mexicano