

Comparación entre sistemas extractantes en extracciones de lípidos de semillas

Fundamento:

Como ensayo de optimización de la extracción de los lípidos, se determinará la variación en la composición de ácidos grasos de los extractos de aceite de semillas, obtenidos con diferentes mezclas extractantes.

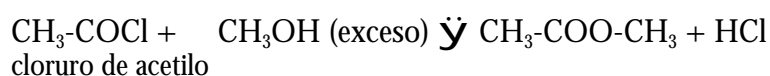
Los sistemas extractantes empleados en estas pruebas serán:

- A. Cloroformo/metanol/agua (1:2:0,8, v/v/v)
- B. Hexano/etanol (1:2,5, v/v)
- C. n-Butanol
- D. Etanol (96%)

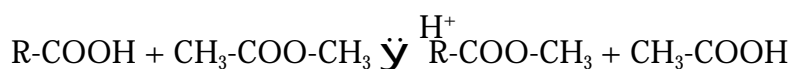
Con los sistemas A y B se utilizará el método de Kates (1988), que consiste en una modificación del de Bligh y Dyer (1959). Mediante este procedimiento, los lípidos son extraídos primeramente en un sistema monofásico a partir del cual se forma seguidamente un sistema bifásico para la separación y purificación final. Este sistema bifásico está compuesto por dos fases: una rica en lípidos (extracto) y otra fase hidroalcohólica pobre en lípidos (refinado). Para los sistemas C y D no es preciso este último paso de purificación final en sistema bifásico.

Los ácidos grasos se determinan como ésteres metílicos tras una reacción de metilación, para a continuación ser inyectados en el C.G., y mediante comparación de sus tiempos de retención con otros obtenidos de patrones puros, cuantificar e identificar el contenido.

La reacción de metilación se produce con cloruro de acetilo y metanol. Se trata de una *catálisis ácida*:



El ácido clorhídrico queda disuelto en el exceso de metanol. En medio ácido fuerte, los ácidos grasos se esterifican para producir los ésteres metílicos:



Material:

- Pipetas de 5 y 1 mL
- Pipetas Pasteur
- Soluciones extractantes
- Tubos de rosca
- Cloruro de acetilo
- Metanol
- Patrón interno
- Cromatógrafo de gases

Procedimiento:

En estas pruebas, se usarán 1 mL de cada uno de los sistemas extractantes por cada 50 mg de biomasa liofilizada y homogeneizada y se realizará la extracción a 60°C durante 10 min bajo constante agitación y en atmósfera de nitrógeno. La mezcla obtenida se filtrará mediante filtros de

fibra de vidrio (100-160 mm). El residuo se lavará con el sistema extractante ensayado, añadiendo seguidamente este lavado al filtrado anterior.

El sistema A (cloroformo/metanol/agua, 1:2:0,8), monofásico, se transforma en bifásico añadiendo 1,9 ml de cloroformo y 1,9 mL de agua, resultando el sistema bifásico cloroformo/metanol/agua 1:1:0,9, (v/v/v), compuesto por una capa superior hidroalcohólica (refinado) y una capa inferior clorofórmica (extracto) donde quedan disueltos la mayoría de los lípidos.

El sistema B aparece representados en el diagrama de fases hexano/etanol/agua (Figura) basado en los datos de equilibrio para este sistema (Bonner, 1910). El sistema B se transformará en el bifásico B' añadiendo 0,5 mL de hexano y 0,5 mL de agua, de manera que puedan separarse un refinado o capa inferior hidroetanólica y una capa superior hexánica (extracto) con la mayoría de lípidos.

Las disoluciones lipídicas finales son evaporadas en corriente de nitrógeno y metiladas para su análisis mediante cromatografía gaseosa.

Metilación de los ácidos grasos

En un tubo de ensayo de rosca, ubicar aproximadamente 1 mg de aceite, y 5 : L patrón interno C19:0 (25 mg/mL tolueno) 1 mL mezcla metilante 1:20 (CH₃COCl: CH₃OH). Observar toda precaución al formar la mezcla metilante, se trata de una reacción muy exotérmica.

Realizar la metilación a 100 °C durante 1h, con agitación cada 10 minutos. A continuación, enfriar e interrumpir el proceso.

Cuando los tubos estén fríos, añadir 1 mL de H₂O. Realizar la extracción: 3x1 mL de hexano: extracto conjunto (ésteres metílicos-hexano), reservar el extracto. A continuación, llevar a sequedad, con N₂ a continuación, resuspender en 0,5 mL de hexano, y ubicar esta solución en un vial, con pipeta Pasteur..

La muestra del vial que se inyecta en el cromatógrafo es 5 : l; por lo que debe de haber 1,25 : g de patrón.

Condiciones de operación en el cromatógrafo de gases:

El método para analizar los ácidos grasos requiere unas condiciones especiales. El programa debe de adquirir los siguientes datos:

Columna capilar usada: *Supelco*, alta polaridad (SP2330).

Flujo del gas portador (N₂): 0,75 L, min⁻¹.

T inyector: 220 °C T inicial del horno: 150 °C

T detector: 260 °C T final del horno: 206 °C

Programa de temperaturas en el horno:

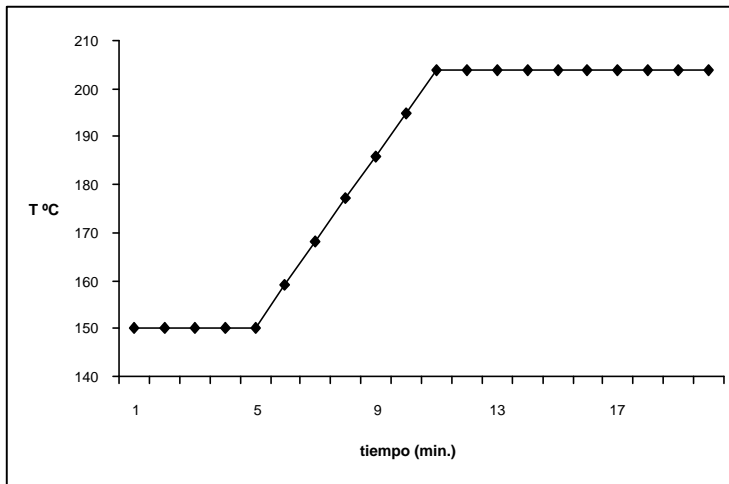
T inicio: 205 °C

rampa: 6 °C/min

T final: 240 °C

tiempo final a Tf = 205 °C: 10 min.

C á
R e
c o
r e
t
e s
t
c o



Programa de temperaturas en el horno del cromatógrafo

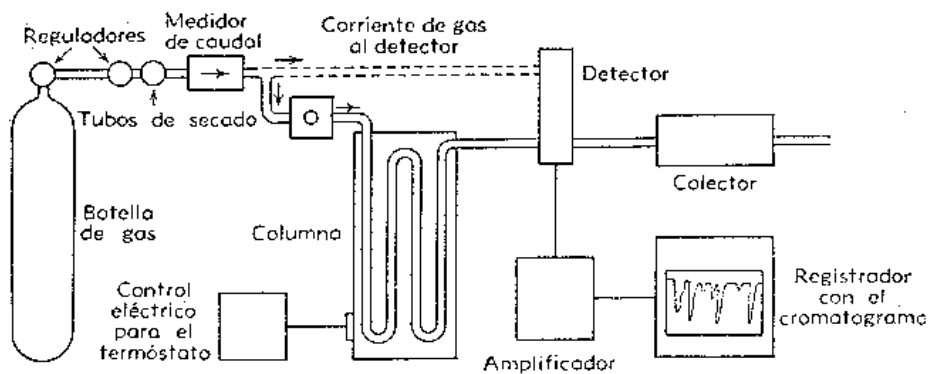
culos:

solver el cromatograma por comparación de los tiempos de retención de cada pico con otros ándar de tiempo de retención conocido.

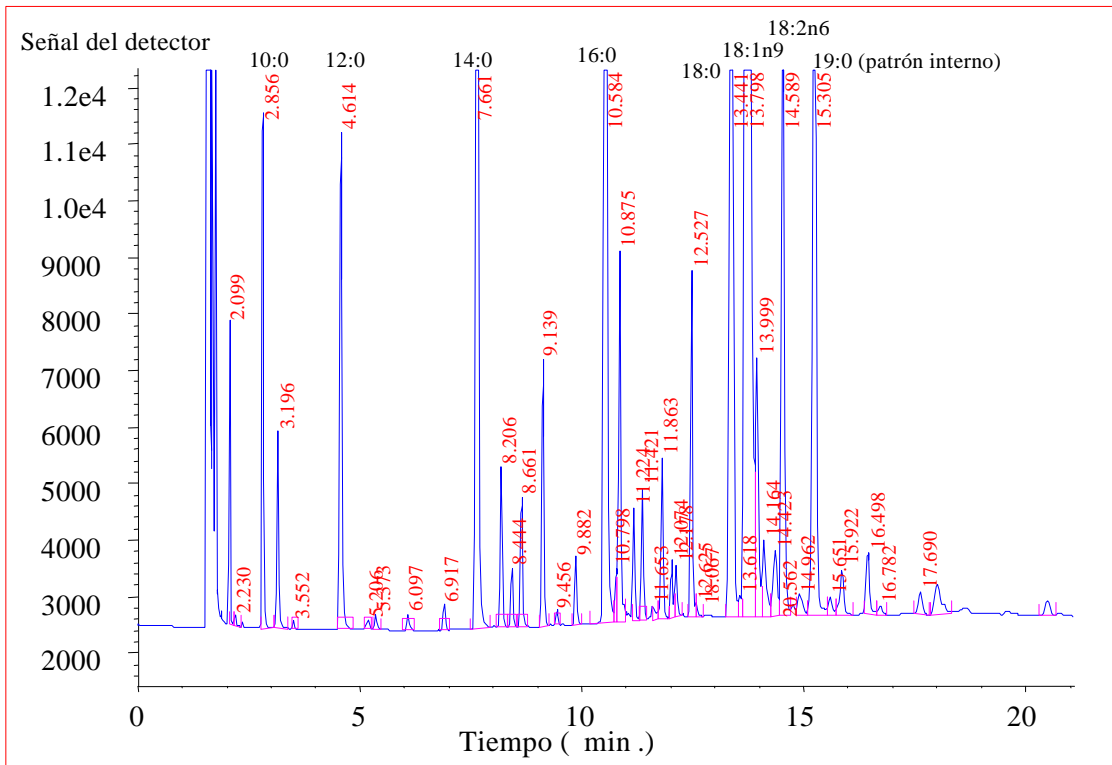
área total de picos: A
área del patrón: B
área real: $a-b = C$

lípidos saponificables (p/p): $0,00125 \times (C \text{ u.a.}/B \text{ u.a.}) \times (0,5 \text{ mL hexano}/0,005 \text{ mL hexano})$

% de un ácido graso en particular de área d: $d \times A/C$



Esquema simplificado de un cromatógrafo de gases



Cromatograma de aceite de oliva

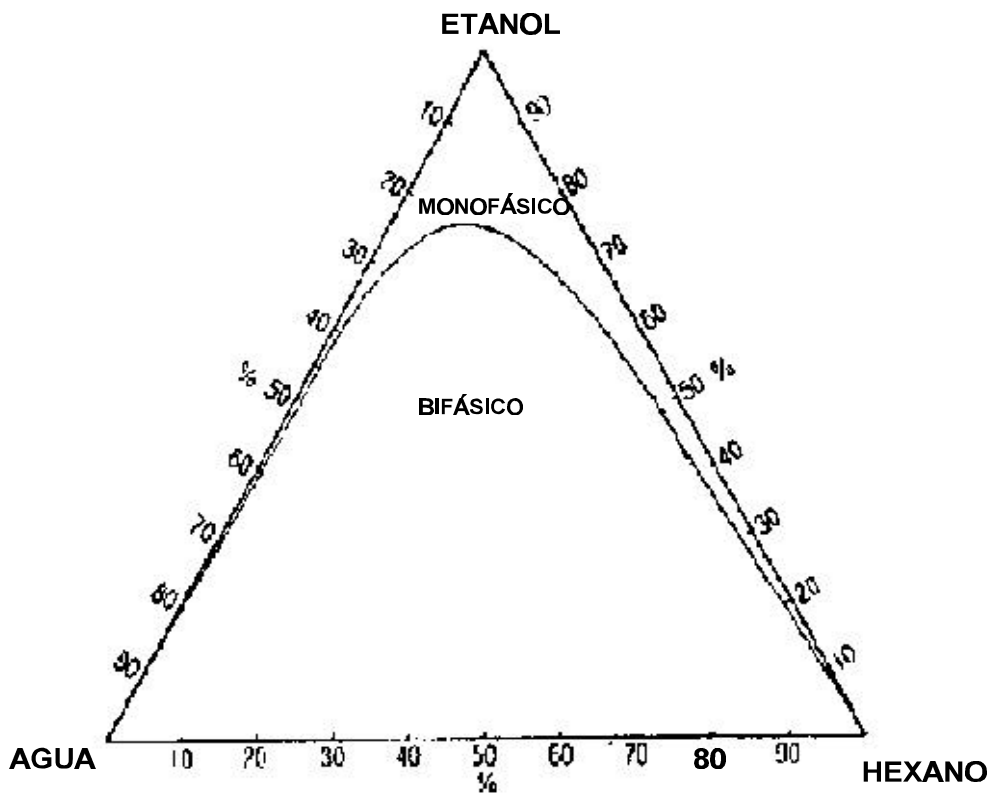
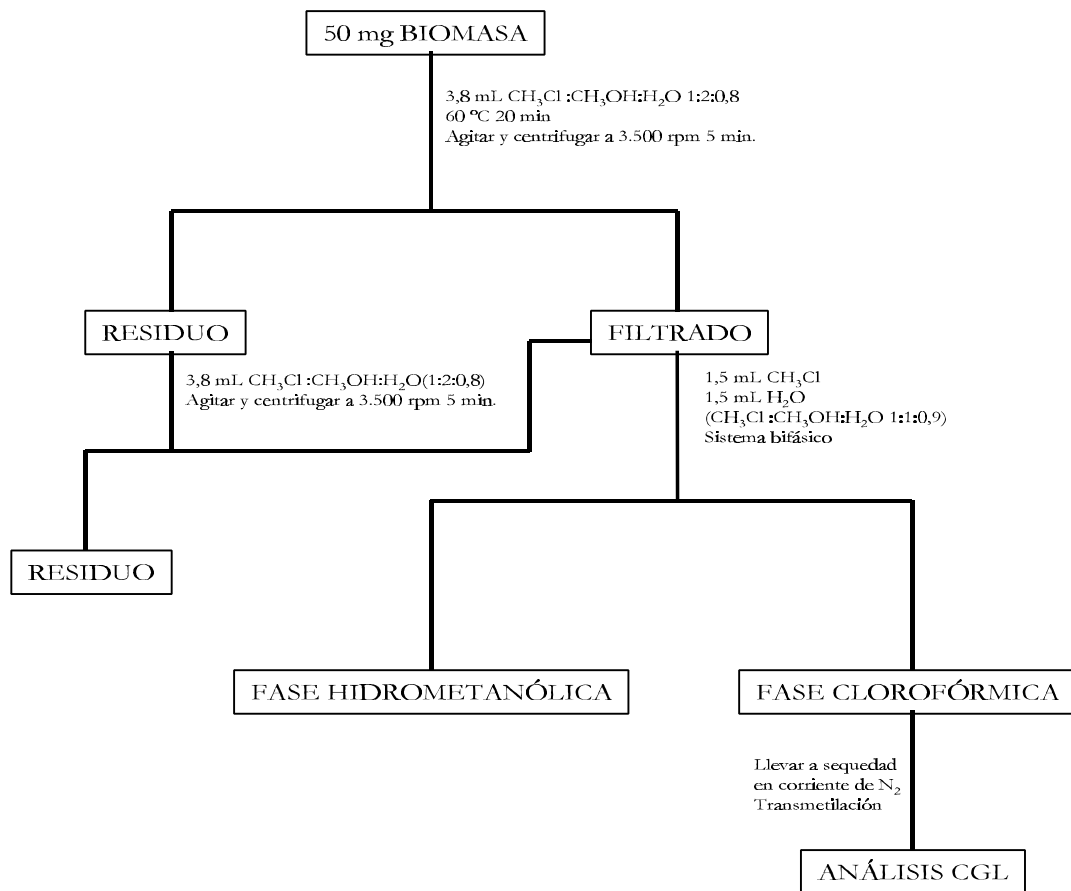


Diagrama de Fases para las mezclas hexano-Etanol-Agua



Resul

tados y cálculos:

- Representar gráficamente en el diagrama ternario los sistemas monofásico y bifásico, respectivamente
- Realizar tablas con porcentajes de pureza y recuperación para cada ácido graso en cada sistema extractante.