

# Tutoriales prácticos de aplicación en Alimentación, Nutrición y Trazabilidad en Acuicultura

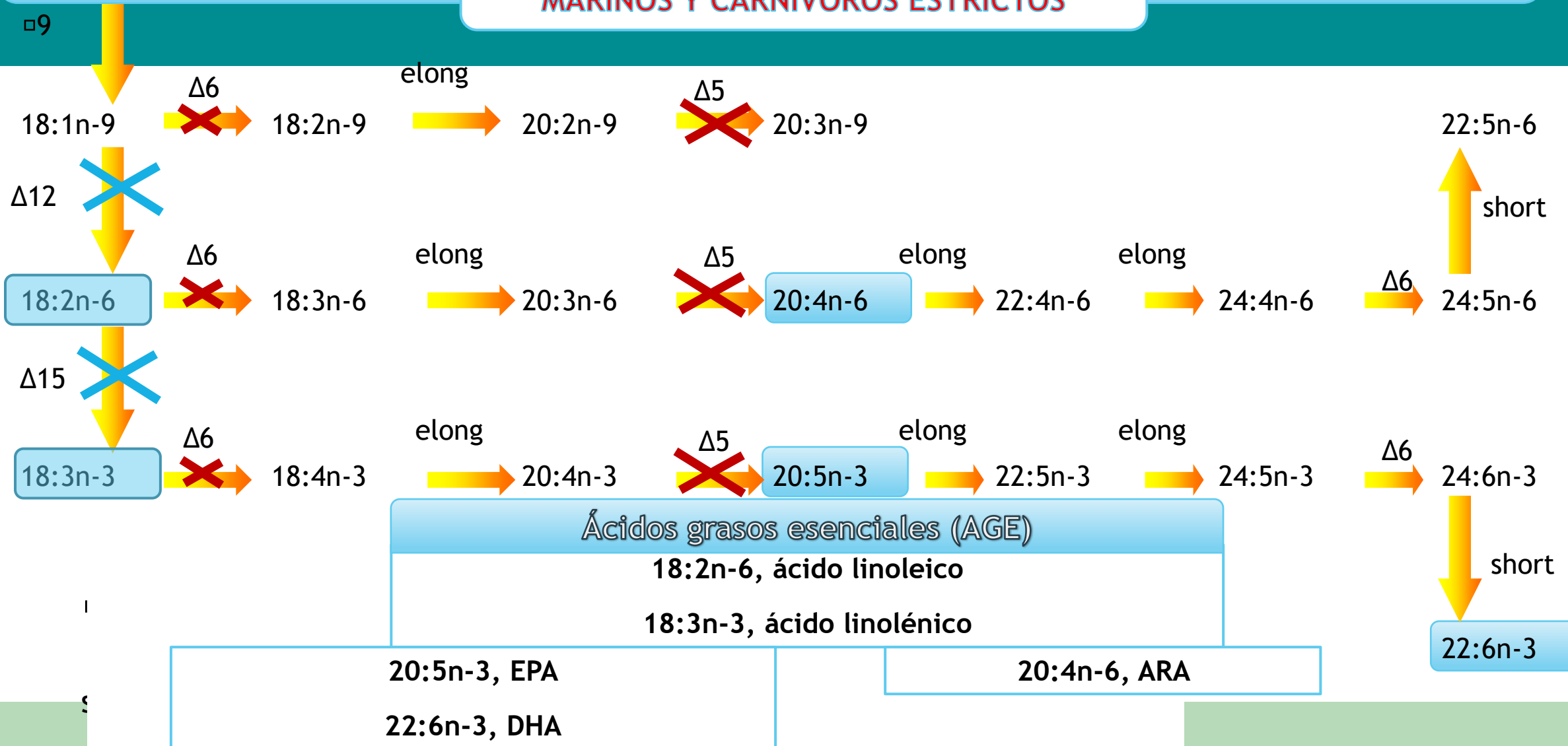
# Práctica 3.1. Protocolos de Análisis lipídicos

# RESUMEN SÍNTESIS Y REGULACIÓN DE PUFAs

1. Long chain Polyunsaturated fatty acids (LC-PUFAs or HUFAs) consist of more than three double bonds and 20 or more carbons and are a group of critical nutrients that modulate brain development and cognition as well as many diseases such as cardiovascular disease, cancers, and diabetes.
2. Twenty-carbon PUFAs are precursors of eicosanoids that regulate inflammatory and immune responses through pro- and anti-inflammatory activities.
3. Docosahexaenoic acid (DHA, 22:6n-3) is also a precursor of anti-inflammatory docosanoids.
4. In humans, LC-PUFAs are synthesized by fatty acid desaturases (FADSs), which are encoded by three genes on the human chromosome 11 and are regulated by PUFA consumption after ingestion of linoleic acid (LA, 18:2n-6) and  $\alpha$ -linolenic acid (ALA, 18:3n-3), which are dietary essential fatty acids in humans.
5. However, only a small proportion of fatty acids is converted to PUFAs consisting of more than 20 carbons.
6. **In general, marine vertebrates, carnivorous and humans have a very poor capacity to produce C20-22 PUFAs, particularly 22:6n-3, and although this capacity is genetically predetermined, dietary fatty acid input as well as environmental factors are able to modulate LC-PUFAs biosynthesis from C18 fatty acid precursors.**

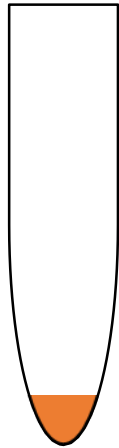
# Ruta de síntesis de los ácidos grasos poliinsaturados en vertebrados

SITUACIÓN MÁS HABITUAL EN ANIMALES MARINOS Y CARNÍVOROS ESTRUCTOS



# EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS (modificación Folch et al. 1957)

Tubo A

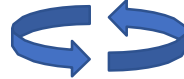


2. Añadir 4 ml de **CL:MET** 2:1 con BHT (como antioxidante) y 1 ml de **KCl** al 0,88% w/v.

Tubo A



3. Agitar y centrifugar en frío a 1.500 revoluciones/min. durante 2 min.



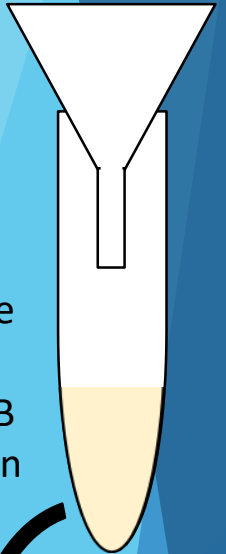
VORTEX

Tubo A



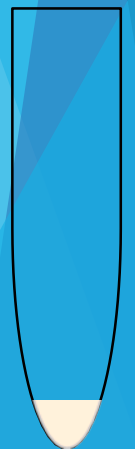
4. Extraer la fase inferior que contiene los lípidos y verter sobre el filtro colocado sobre el embudo del Tubo B (el filtro es lavado previamente con un poco de CL:MET).

Tubo B



5. Evaporar el contenido del Tubo B con **Nitrógeno**

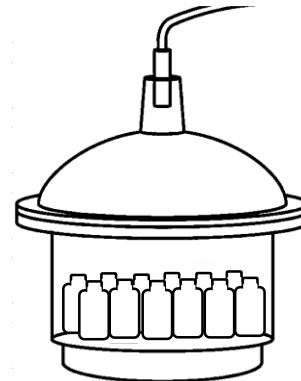
Tubo B



6. Pasar la muestra al bote pequeño (previamente rotulado y pesado) lavando con CL:MET

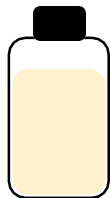


7. Evaporar con **Nitrógeno** el CL:MET



8. Colocar los botes sin tapa en oscuridad, bajo vacío y en desecador durante 1-2 horas mínimo.

9. Pesar los botes y calcular la cantidad de lípido por diferencia de pesadas.

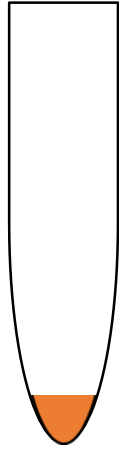


10. Redisolver con Cl:MET a una concentración de 10 mg/ml. Llenar de nitrógeno, etiquetar y guardar en congelador a -20 °C.

1. Pesar 0,5 g de Artemia en un tubo de ensayo previamente calibrado a cero y rotulado

# TRANSMETILACIÓN DE LÍPIDOS. OBTENCIÓN DE ÉSTERES METÍLICOS DE ÁCIDOS GRASOS (FAME\*)

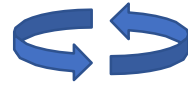
Tubo A



2. Evaporar el contenido con **Nitrógeno**.



VORTEX

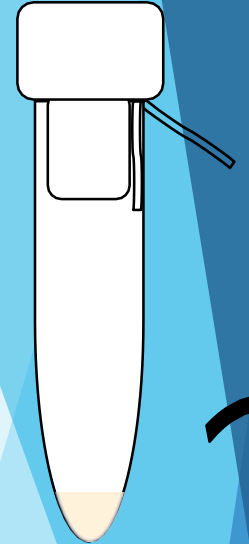


3. Añadir 1 ml de **Tolueno** y 2 ml de **Sulfurico** al 1% en **Metanol** v/v.



\*FAME; del inglés Fatty Acid Methyl Esters

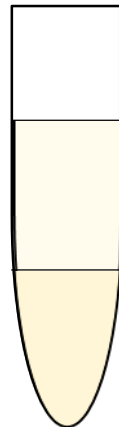
4. Llenar el tubo con nitrógeno y tapar herméticamente (pellizcando tubo y tapa con papel de filtro para evitar que salte la tapa con los gases).



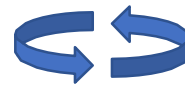
5. Dejar reaccionar durante 18 horas a 50°C en un bloque calefactor y en oscuridad.

1. Coger 1 mg de lipido extraído de la muestra, y añadir 5% (50 µg) de **estandar interno** (19:0).

Tubo A



VORTEX



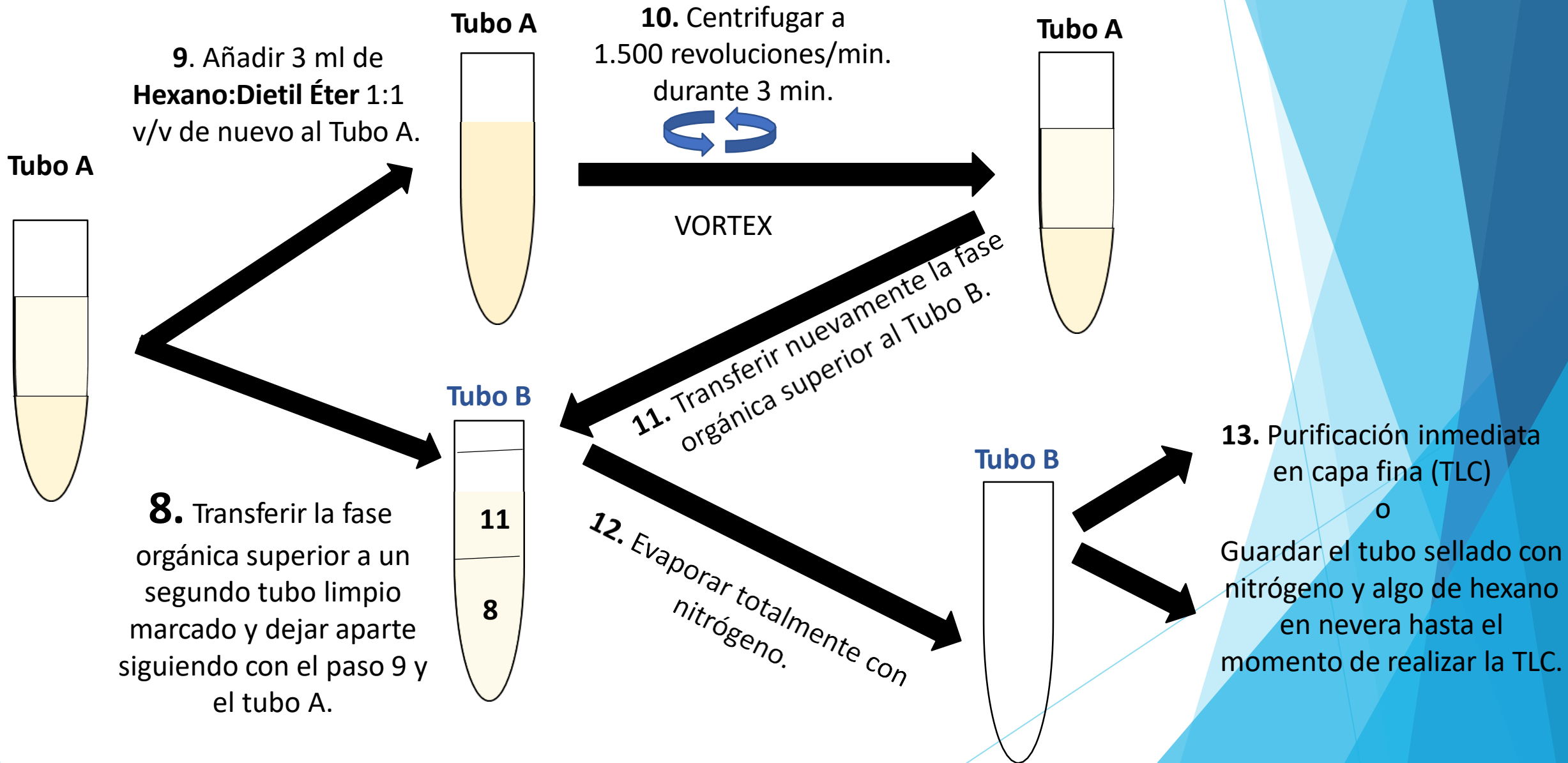
7. Centrifugar a 1.500 revoluciones/min. durante 3 min.



6. Añadir 5 ml de **Hexano:Dietil Éter** 1:1 v/v y 2 ml de **KHCO<sub>3</sub>** al 2% w/v.



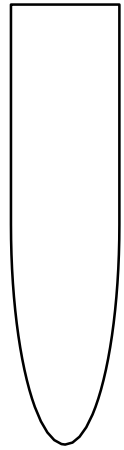
# TRANSMETILACIÓN DE LÍPIDOS. OBTENCIÓN DE ÉSTERES METÍLICOS DE ÁCIDOS GRASOS (FAME\*)





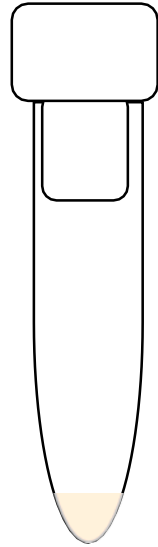
# PLACA DE TLC. PURIFICACIÓN DE LOS ÉSTERES METÁLICOS DE ÁCIDOS GRASO

Tubo B



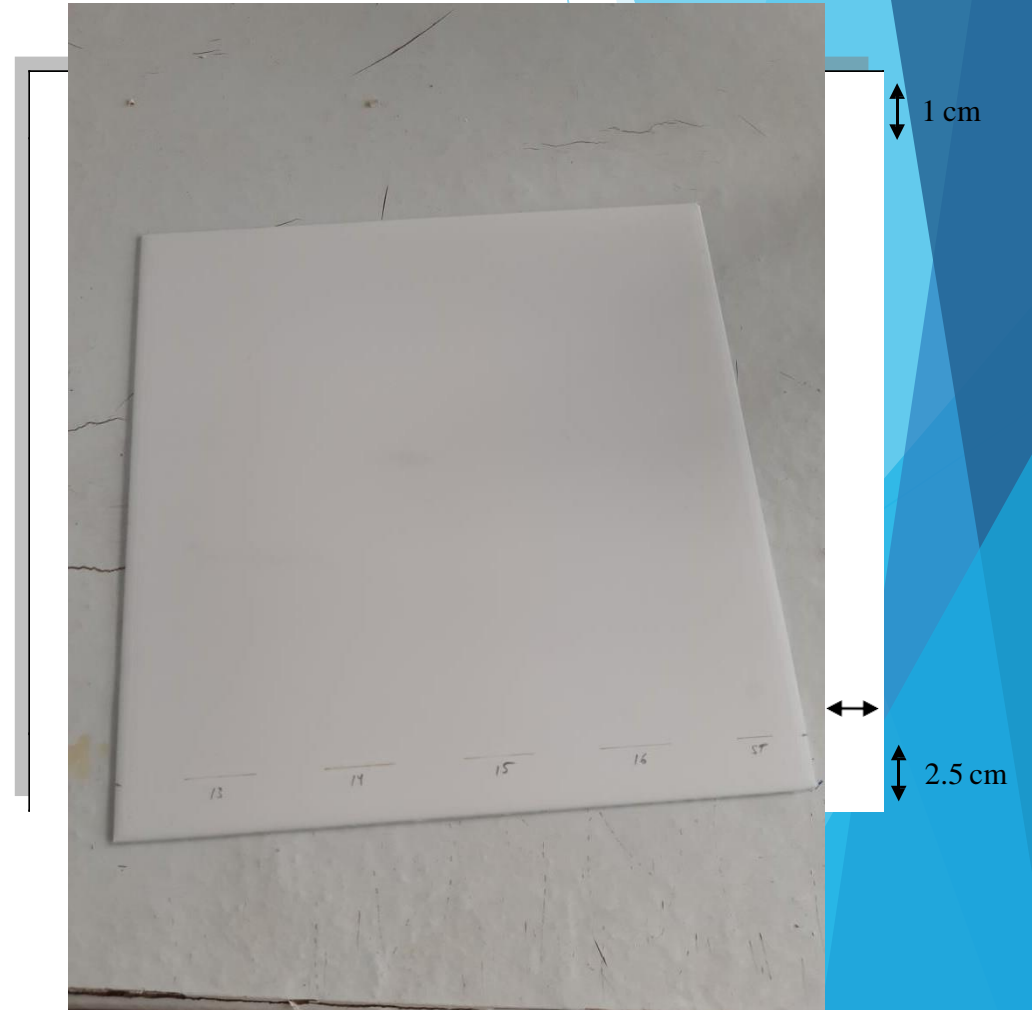
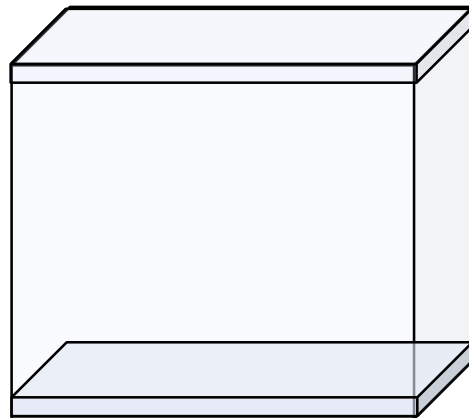
VORTEX

1. Añadir 100  $\mu$ l de Hexano.



2. Tomamos la placa de TLC y la marcamos con un lápiz muy blando y con los siguientes márgenes:

3. Preparar y verter una solución de **90 ml Hexano, 10 ml Éter y 1 ml Ácido Acético** en una cubeta y tapar para que todo el volumen se sature y ayude así a que la placa corra más rápidamente.

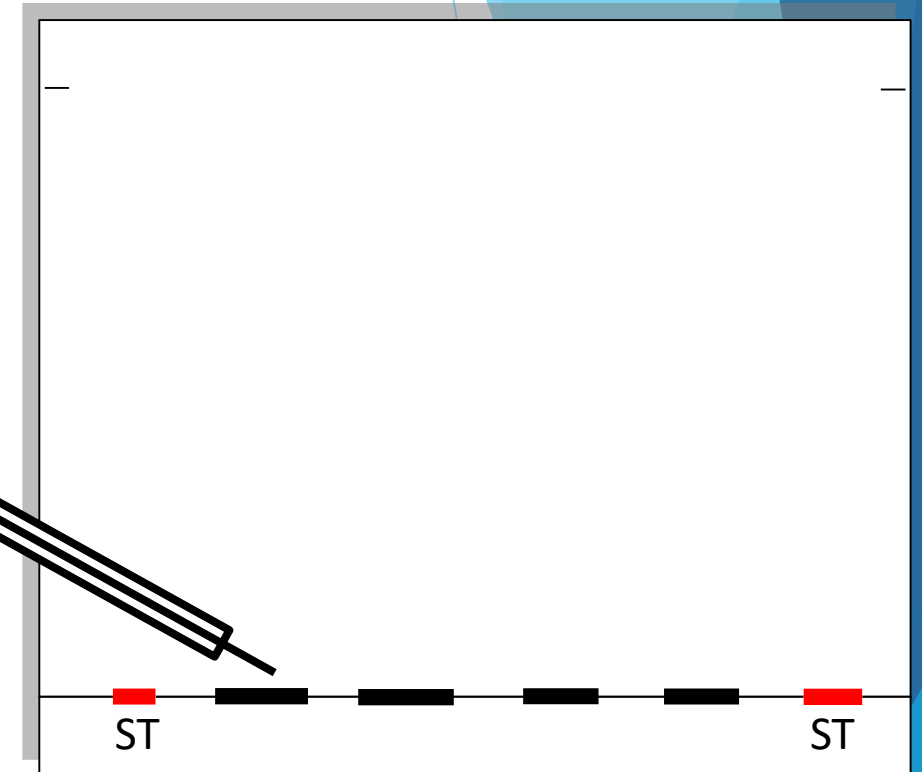
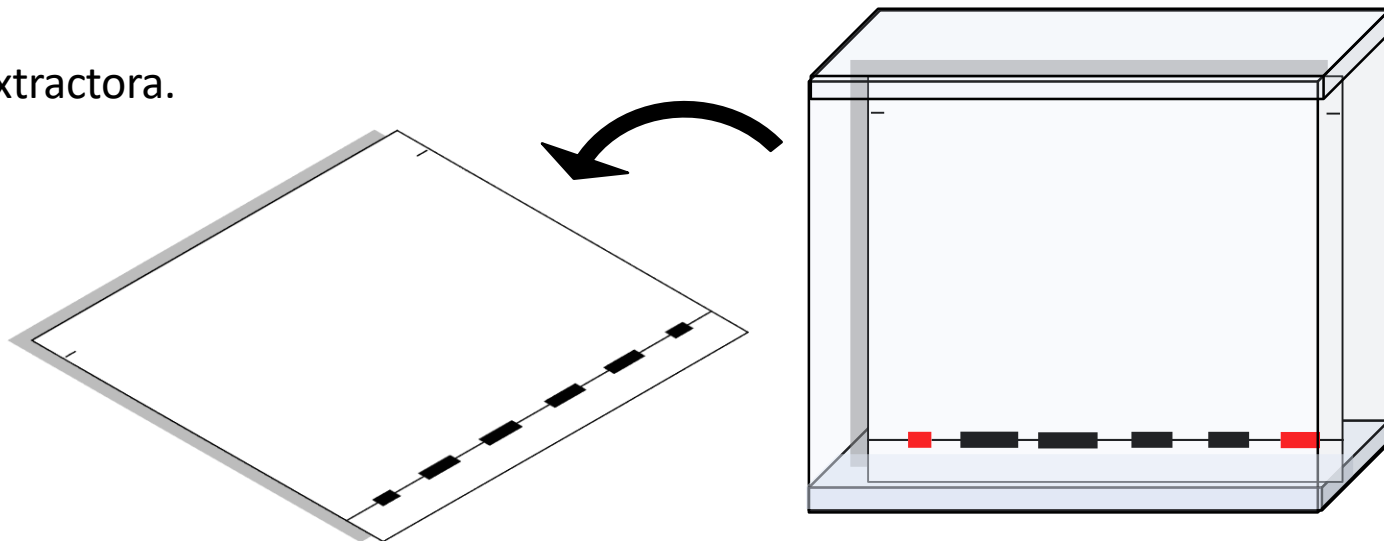




# PLACA DE TLC. PURIFICACIÓN DE LOS ÉSTERES METÁLICOS DE ÁCIDOS GRASO (cont.)

- ▶ 4. Con una microjeringa, depositar sobre la placa y en la marca correspondiente, 50  $\mu\text{l}$  de solución de ESTÁNDAR EXTERNO (ST; una muestra metilada que ayuda a identificar la posición de nuestros ésteres metálicos en la placa). Y cada una de las muestras ya diluidas en el Tubo B.
- ▶ 5. Lavar bien con hexano la microjeringa entre muestra y muestra.
- ▶ 6. Una vez que el disolvente llega a la marca situada a 1 cm del borde superior, se retira la placa de la cubeta y se espera a que se seque un poco al aire y bajo campana

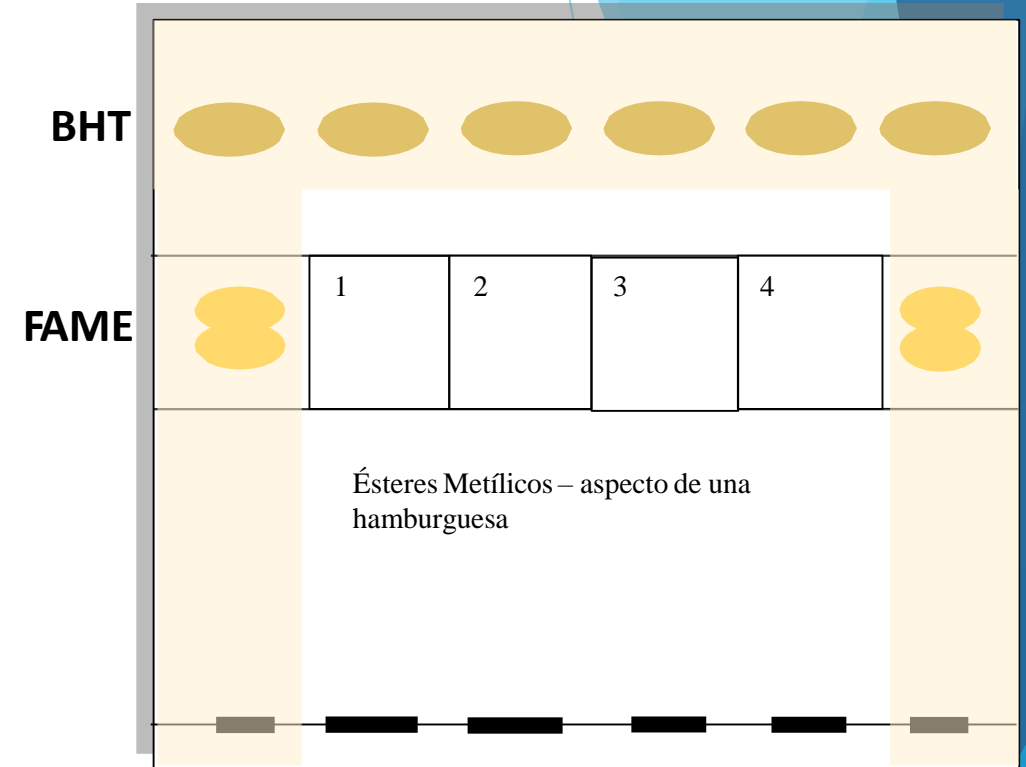
extractora.



- ▶ 5. Colocar la placa verticalmente en la cubeta y apoyada en la pared. Tapar la cubeta.

# PLACA DE TLC. PURIFICACIÓN DE LOS ÉSTERES METÍlicos DE ÁCIDOS GRASO (cont.)

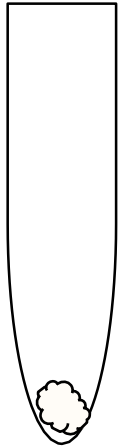
7. Pulverizar de forma homogénea, con solución de **IODINA**, sólo los laterales de la placa donde está el estándar, tapando el resto con una placa de cristal, de manera que los laterales de la placa queden ligeramente teñidos de color amarillo-naranja. Teñir también la zona superior donde corre el BHT. Con el lápiz blando marcamos, desde ambos extremos, la banda donde estarían los FAME de las muestras (1,2,3,4), marcando también las líneas verticales.



8. Se rasca la sílice de cada banda enmarcada, recogéndola sobre un folio limpio y pasándola a un tubo de ensayo rotulado.

# PLACA DE TLC. PURIFICACIÓN DE LOS ÉSTERES METÁLICOS DE ÁCIDOS GRASO (cont.)

**Tubo C**

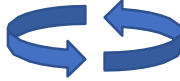


**9.** Añadir 10 ml de **Hexano:Dietil Éter 1:1** v/v a la sílice.

**Tubo C**



**10.** Centrifugar a 1.500 revoluciones/min. durante 5 min.



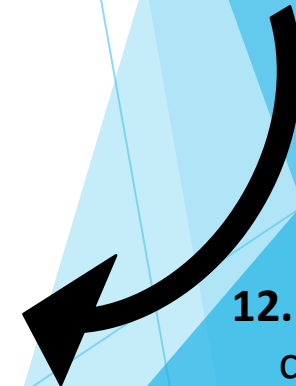
VORTEX

**Tubo C**

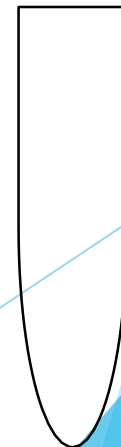


**11.** Transferir la fase superior a otro Tubo.

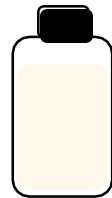
**Tubo D**



**12.** Evaporar el contenido con **Nitrógeno**.



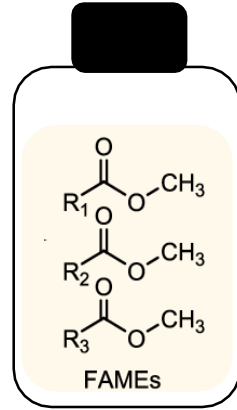
**13.** Lavar el tubo con 1 ml de **Hexano** (de 3 veces) y pasar la muestra a un bote pequeño previamente etiquetado.



**14.** Guardar en el congelador (-20°C) con nitrógeno, hasta el momento de la inyección en el cromatógrafo de gases (GC).

# PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA EL CROMATÓGRAFO DE GASES. INYECCIÓN DE LAS MUESTRAS.

Los FAME obtenidos tras el proceso de transesterificación, han quedado disueltos en hexano, en viales etiquetados y sellados con nitrógeno, a  $-20^{\circ}\text{C}$  y a una concentración aproximada de 1 mg/ml.



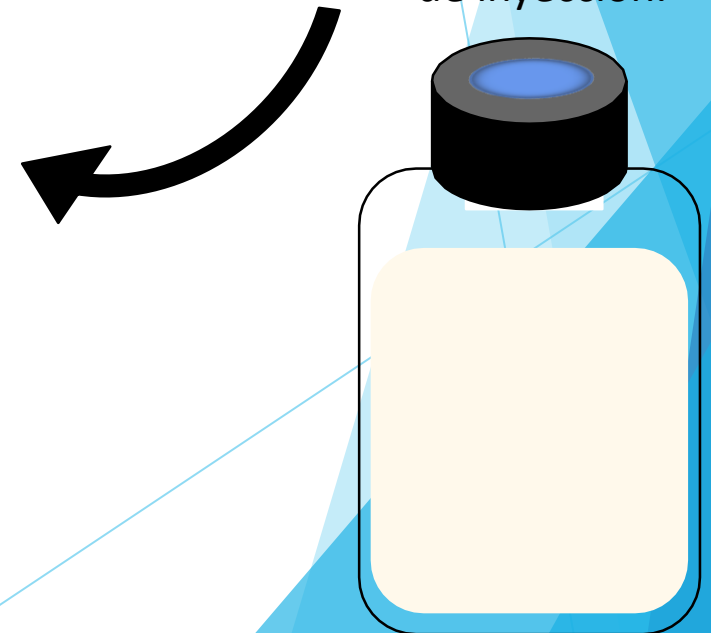
Las muestras contienen además **BHT** que junto con el **nitrógeno**, la **baja temperatura** y la **oscuridad**, evita la oxidación de los ácidos grasos.



**16.** Colocar las muestras en la gradilla situada en el sistema de autoinyección del cromatógrafo.

La aguja del autoinyector tomará  $0,6\ \mu\text{l}$  de cada una de las muestras, inyectándolas a intervalos de tiempo regulares (1h aprox.) y bajo condiciones preestablecidas en el cromatógrafo.

**15.** Colocar en el vial una tapa con un septum perforable por la aguja de inyección.



# ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS

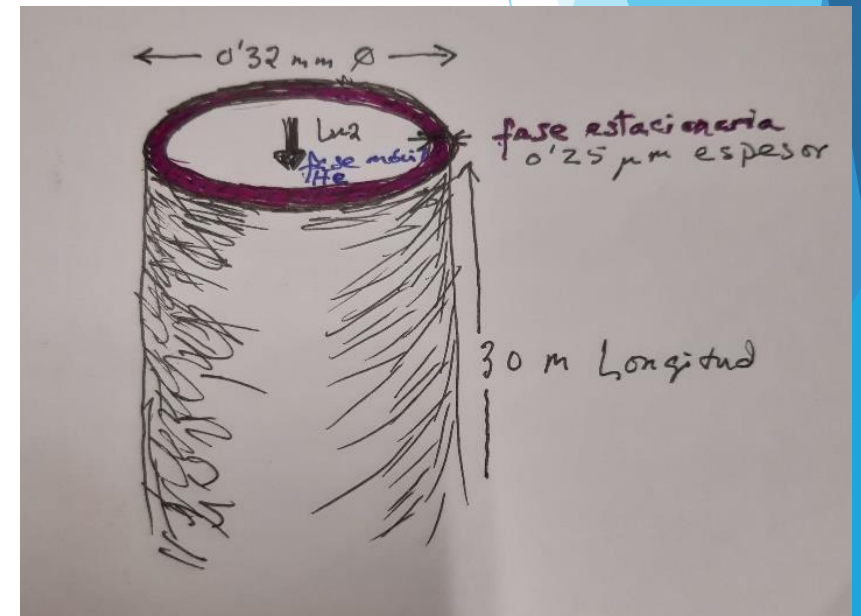
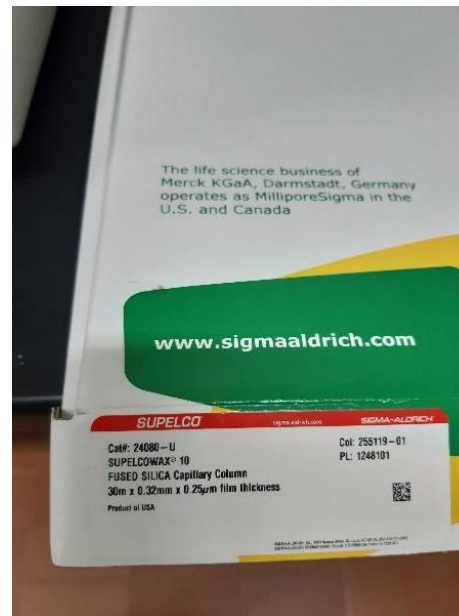
(DE SUS DERIVADOS FAMES, Fatty Acid Methyl Esters):

## POR CROMATOLOGRAFÍA DE GASES

La Cromatografía de Gases, como cualquier cromatografía, consta de **2 Fases**:

**FASE MÓVIL:** es gaseosa (cromatografía de gases). En nuestro caso es el gas **He** (que además fluye por la luz de una columna a 1'5 mL/min).

**FASE ESTACIONARIA:** es polar (Wax©), y está embebida tapizando interiormente una columna, dejando una luz por donde fluye el He. Las columna es tan fina que por eso se llama capilar (de cabello). Nuestra columna mide 30 m de longitud, 0'32 mm de diámetro y la capa de fase estacionaria mide 0'25 µm de grosor.





## En el proceso de la Cromatografía de gases se puede diferenciar varias etapas:

1. **Inyección: se realiza on-column.** Permite la inyección de muestras bastante pequeñas sin que exista pérdida. Se inyecta directamente en la columna o precolumna.
2. **Separación en columnas capilares de sílice fundida.** Estas columnas son de diámetro muy pequeño y de gran longitud. Tras la inyección el proceso de separación de los diferentes ácidos grasos se realiza con una Tª programada, permitiendo que en función de su polaridad, que viene dada por la longitud, el grado de saturación, la serie a la que pertenece, etc., sean retenidos a diferentes tiempos los distintos ácidos grasos, y cuando se sueltan de la fase estacionaria, sean desplazados por el gas portador hacia el detector, que se encargará de determinar en qué cantidad se encuentra cada uno de ellos.
3. **Detector de ionización en llama (FID).** Se forma una llama gracias al aporte directo de los gases  $H_2$  y  $O_2$  (proporcionado por una fuente de Aire). Los FAMES, separados gracias a la columna, son el combustible que va llegando en diferentes tiempos al FID. El detector emite una señal eléctrica proporcional a la cantidad del FAME en cuestión. Esta señal es enviada al integrador, quien finalmente será el encargado de atribuir a cada una de estas señales eléctricas un pico, con un área concreta que será proporcional a su porcentaje en el total de la muestra inyectada. Cada pico saldrá en un **Tiempo de Retención**, que a su vez es función de la polaridad de cada compuesto. Podemos analizar los FAMES a través de los **cromatogramas** obtenidos, de forma que sabemos cuánto hay (por la cantidad de señal eléctrica-porcentaje) y cuál es (al comparar los Tiempos de Retención con **Estándares conocidos**).



## GASES

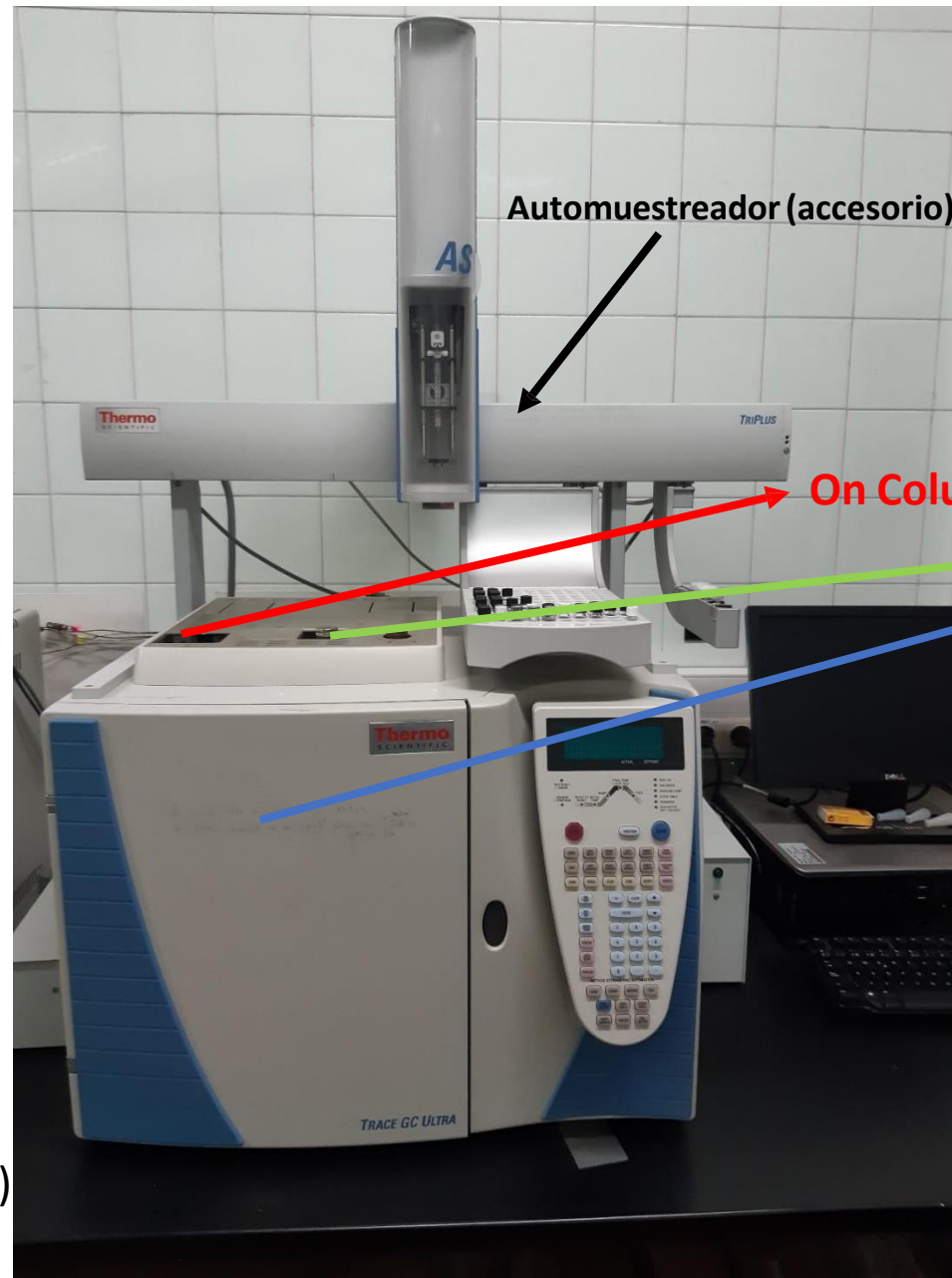


↓ **H<sub>2</sub>** (Va al FID)

↓ **He** (Fase Móvil)

↓ **Aire** (Con **O<sub>2</sub>**, que va al FID)

## CROMATÓGRAFO



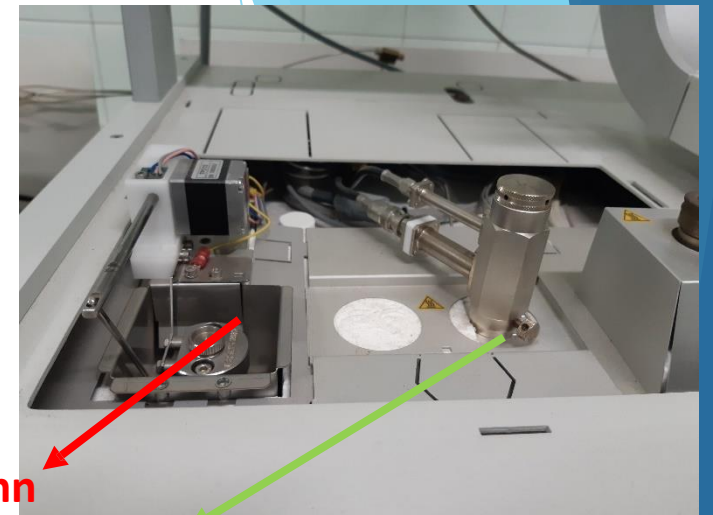
Automuestreador (accesorio)

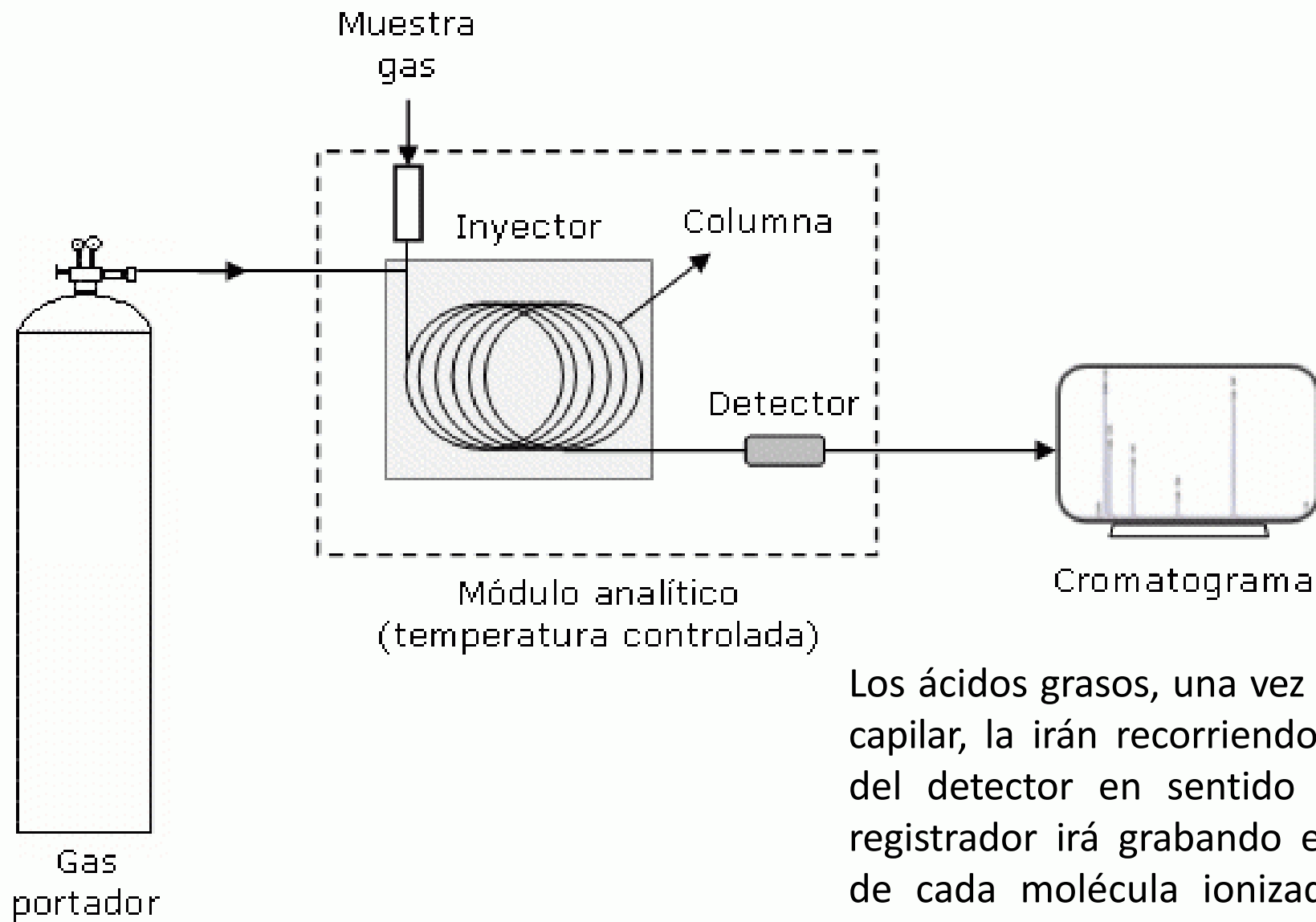
On Column

FID

Horno con Precolumna y Columna

## Detalles (partes abiertas)



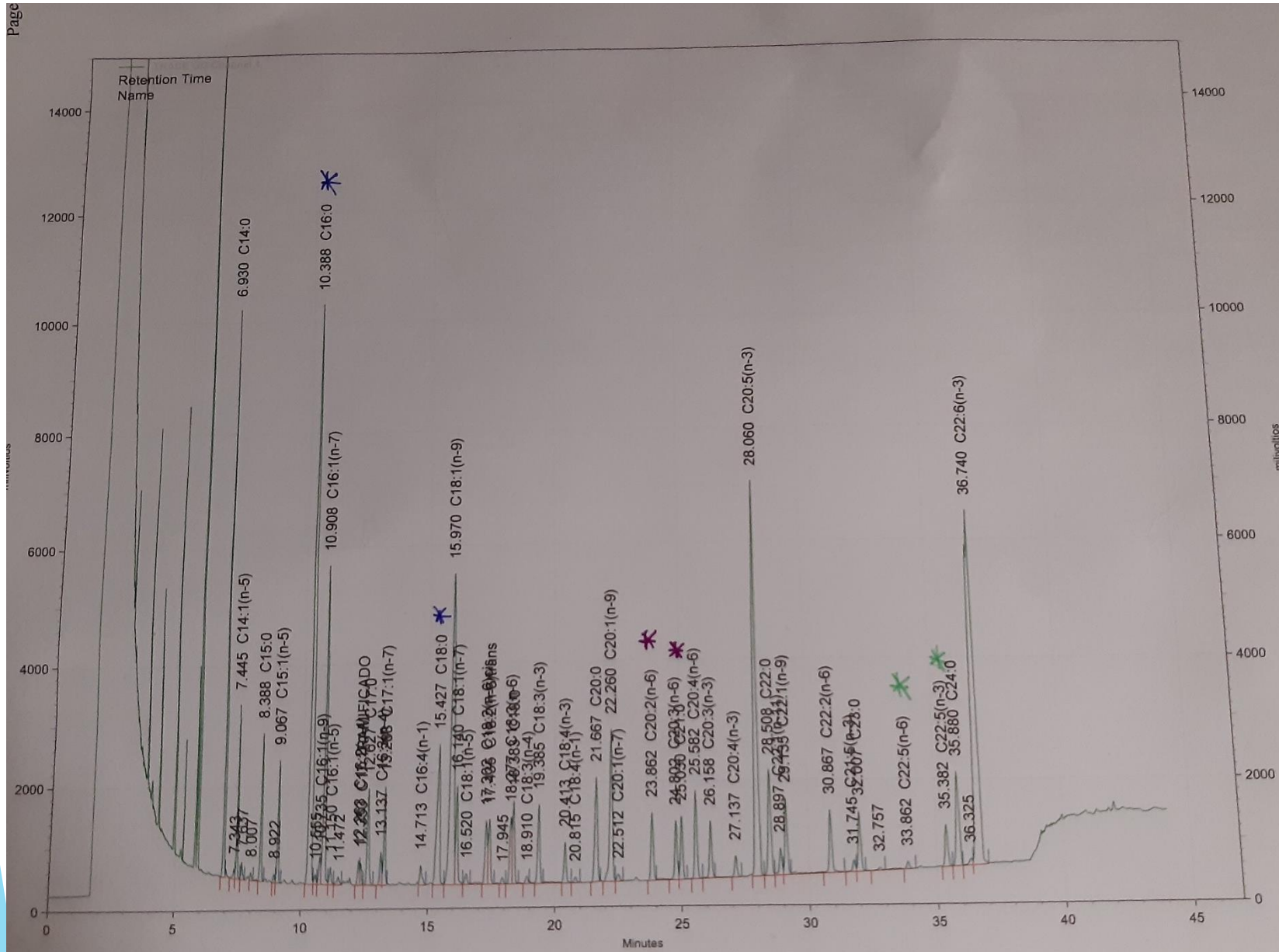


Los ácidos grasos, una vez en el interior de la columna capilar, la irán recorriendo hasta salir por el extremo del detector en sentido creciente de polaridad. El registrador irá grabando e integrando la información de cada molécula ionizada en áreas y tiempos de retención que se corresponden con cada uno de los ácidos grasos, en cada una de las muestras.

## FUNDAMENTO

- **Cromatografía de gases:** la muestra se tiene que **volatilizar** para que pueda ser transportada por **la fase móvil gaseosa**, en nuestro caso He. Por eso, las muestras han de presentar puntos de vaporización relativamente bajos. En este sentido, los ácidos grasos que queremos analizar se vaporizan difícilmente, por eso son transformados en sus derivados ésteres metílicos (FAMEs, Fatty Acid Methyl Esters) que sí se vaporizan fácilmente. Por tanto, analizamos ácidos grasos a través de sus FAMEs correspondientes.
- La **fase estacionaria** es **polar**. Además, la **fase móvil** no interacciona con los FAMEs, sólo es un **mero transportador**. La separación de los diferentes FAMEs ocurrirá por la interacción de éstos con la fase polar , que además es modulada por la temperatura, de ahí la importancia de tener una buena rampa o función de temperatura para tener buenas resoluciones. En este sentido, **saldrán antes** las sustancias **menos polares** ya que interactúan poco con la fase estacionaria, siendo menos retenidas. Las sustancias **más polares** interactúan más, siendo más retenidas y saliendo, por tanto, **más tarde**.

## CROMATOGRAMA DE FAMES



Si explicamos la polaridad con interacciones eléctricas, entonces podemos justificar que:

★ Los FAMES mayores salgan más tarde (más carbonos). Ver 16:0 y 18:0.

★ Los FAMES con mayor nº de dobles enlaces salen más tarde. Ver 20:2n-6 y 20:3n-6.

★ A igualdad de longitud y dobles enlaces, los FAMES de la serie n-3 salen más tarde que los de la serie n-6, debido a la posición más cercana al metilo terminal del primer doble enlace. Ver 22:5n6 y 22:5n-3.



Tutorial realizado por:



Dra. Covadonga Rodríguez



Dra. Ana Galindo



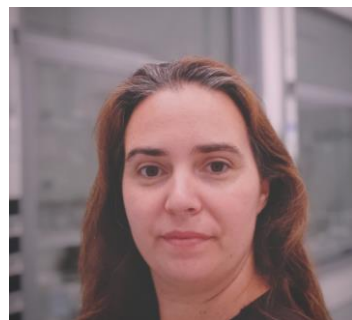
Dr. Manuel Marrero



Dr. José A. Pérez



Dra. Deiene Rodríguez



Dra. Diana B. Reis



Jesús Villora



Nieves G. Acosta