



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**MÉTODOS DE SEPARACIÓN PARA EL ANÁLISIS QUÍMICO Y DESARROLLO
TECNOLÓGICO: CARACTERIZACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS EN ACEITE DE
OLIVA POR CROMATOGRAFÍA DE GASES**

SERVICIO SOCIAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACEÚTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

BEATRIZ NAVA GRANADOS

Asesores:

Dra. Guadalupe Pérez Caballero

Q. Pablo Hernández Matamoros



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.	1
OBJETIVOS.	3
HIPOTESIS.	4
1. GENERALIDADES.	5
1.1 Aceite de oliva	5
1.2 composición.	5
1.3 Ácidos grasos.	7
1.3.1 Propiedades de los principales ácidos grasos presentes en el aceite de oliva.	7
1.3.1.1 Ácido oleico.	7
1.3.1.2 Ácido linoleico.	8
1.3.1.3 Ácido Linolénico.	9
1.4 Elaboración del aceite de oliva.	10
1.5 Definiciones y denominaciones de los aceites de oliva.	12
1.5.1 Tipos de aceite de oliva.	12
1.5.1.1 aceites de oliva vírgenes.	12
1.5.1.2 aceite de oliva refinado.	13
1.5.1.3 aceite de oliva compuesto exclusivamente por aceites de oliva refinados y aceites de oliva vírgenes.	13
1.5.1.4 Aceite de orujo de oliva crudo.	13
1.5.1.5 Aceite de orujo de oliva refinado.	14
1.5.1.6 Aceite de orujo de oliva.	14
1.6 Características organolépticas.	14
1.7 Parámetros que definen la categoría de un aceite de oliva virgen.	15
1.7.1 Grado o índice de acidez.	15
1.7.2 Índice de peróxidos.	15
1.7.3 Valoración organoléptica.	15
1.8 Cromatografía.	16
1.8.1 Cromatografía de gases.	16
1.8.2 Instrumentación.	17
1.8.2.1 Gas portador o acarreador.	17
1.8.3 Introducción de la muestra.	18

1.8.4	Tipos de inyectores.	18
1.8.4.1	Inyección de vaporización directa.	18
1.8.4.2	Inyector split/splitless.	19
1.8.4.3	Inyector “on column”	19
1.8.5	Columnas.	20
1.8.5.1	Columnas empacadas.	20
1.8.5.2	Columnas capilares.	20
1.9	Derivatización.	22
1.10	Curva de calibración con estándar Interno.	23
2.	DESARROLLO EXPERIMENTAL.	24
2.1	Equipo y Material de laboratorio.	24
2.2	Reactivos.	24
2.3	Soluciones.	25
2.3.1	Solución de estándar de ácidos grasos.	25
2.3.2	Solución de estándar Interno.	25
2.4	Diagrama de Flujo.	26
2.5	Procedimiento experimental.	27
2.5.1	Preparación de estándares de ácidos grasos insaturados.	27
2.5.2	Preparación de curva de calibración con estándar interno.	27
2.5.3	Separación cromatográfica de los ácidos grasos.	29
2.5.4	Preparación de la curva de calibración con estándar interno.	29
2.5.5	Muestras analizadas.	30
2.5.6	Optimización de las condiciones de derivatización.	30
3.	RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.	32
3.1	Elección del estándar interno.	34
3.2	Análisis de la linealidad.	36
3.3	Cuantificación de muestras	39
3.4	Tratamiento Estadístico.	40
4	CONCLUSIONES.	47
5	REFERENCIAS.	48
6	ANEXOS.	50
6.1	Anexo No.1”Cromatogramas”.	50
6.2	Anexo No. 2 “Marcas Comerciales de Aceites Analizados”	55
6.3	Anexo No. 3 “Diseño de Práctica”	61

D e d i c a t o r i a

A mis padres: Sr. Jesús Nava Gómez y Sra. Gloria Granados Méndez por el apoyo y cariño que a lo largo de mi vida siempre me han brindado.

A Gerardo y a Mariana. Mis motivos.

A la memoria de dos grandes hombres que fueron mis abuelos:

Sr. Sabino Nava Flores.
Sr. José Carmen Granados Montoya.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por los conocimientos adquiridos en sus aulas y mi formación profesional.

Mi mas sincero agradecimiento a mis asesores: Profesor Pablo Hernández Matamoros y a la Maestra Guadalupe Pérez Caballero, por su generosa amabilidad, su tiempo y paciencia en la dirección del presente trabajo.

A todos mis maestros.

Al Sr. Drausin Jiménez Celi por la elaboración de los embudos de separación especiales para este proyecto.

A DGAPA-UNAM por el apoyo otorgado al proyecto PAPIME PE-23405.

Al Laboratorio de Investigación L-103 de Q. A. de la FESC-UNAM por el material y equipo de laboratorio.

A la Sección de Alimentos, por permitir el uso del cromatógrafo de gases de la nave 2000, de la FESC-UNAM.

INTRODUCCIÓN

Los aceites de oliva, particularmente el tipo virgen, tradicionalmente se obtienen del fruto maduro del árbol del olivo (*Olea europea* L.) por medios mecánicos y sin uso de calor[1]. Estos aceites son muy cotizados debido a que son considerados de mejor sabor y contenido nutritivo y su consumo reduce los riesgos de enfermedades del sistema circulatorio [2]. Al ser este aceite, el aceite comestible el de más alta calidad y el de mayor precio dentro del mercado, se ha propiciado la adulteración del mismo con otros aceites más baratos, por lo que desde el punto de vista comercial y de salud es de gran importancia verificar su autenticidad. [3]

La necesidad de detectar adulteraciones en aceites de oliva quedó de manifiesto cuando en mayo de 1981, después de haber consumido aceite adulterado con semillas de nabo 20,000 personas enfermaron y 350 fallecieron en España. [4] Anualmente, el valor del aceite de oliva producido asciende a \$2.5 billones de dólares, se producen 9.4 millones de toneladas de aceitunas de 805 millones de árboles en todo el mundo, que ocupan 24 millones de acres de terreno. [5] El 98% de estos árboles están en el área del mediterráneo. De los 60 millones de toneladas de aceites de semillas que se consumen en el mundo cada año 2 millones son de aceite de oliva. [6]

El análisis de los ácidos grasos que contienen los alimentos lípidos, normalmente es complicado debido a la presencia de gran diversidad de otros componentes. En la producción de aceites de oliva, la composición de los ácidos grasos ha sido usada tradicionalmente en la industria alimenticia como un parámetro indicador de pureza y como uno de los principales puntos de determinación de adulteración. Para identificar y cuantificar estos compuestos se requiere de una técnica de análisis de alta sensibilidad, de reactivos y solventes con un alto grado de pureza. Las técnicas cromatográficas han probado ser particularmente adecuadas para estas determinaciones, subrayando que una de las ventajas es su relativo bajo costo. [7] Para su análisis por medio de cromatografía de gases capilar requieren ser derivatizados o convertidos a metil ésteres de ácidos grasos (FAMES). [8] La derivatización es utilizada por dos razones principalmente: Para permitir el análisis de compuestos que no es posible de manera directa debido a

inadecuada volatilidad o estabilidad y para mejorar el análisis al mejorar el comportamiento cromatográfico o la detectabilidad del analito.[9]

El uso de columnas capilares mejora notablemente la resolución de la separación y la precisión del análisis en términos de calidad, cantidad, sensibilidad y tiempo.

En el presente trabajo, en particular, se determinará la composición de los FAME's de tres diferentes marcas de aceite de oliva de la variedad extra virgen y constituye el inicio de una investigación más ambiciosa que sirva para identificar aquellos parámetros que permitan establecer una relación entre la composición y el origen de un aceite, con la finalidad de determinar la autenticidad de los aceites comerciales que se expenden en el país.

La finalidad del presente trabajo es utilizar los conocimientos adquiridos en la asignatura de análisis III de la carrera de QFB, ya que la cromatografía de gases es parte de ese curso.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Desarrollar un método que permita separar, identificar y cuantificar los ácidos grasos presentes en tres diferentes tipos de aceite de oliva (de origen español, italiano y mexicano) por cromatografía de gases capilar, con el fin de detectar la calidad de los mismos.

OBJETIVO ACADEMICO:

Adecuar un método que permita cuantificar los ácidos grasos de diferentes orígenes de aceite de oliva por cromatografía de gases capilar, para detectar la calidad el mismo con el propósito de usarlo posteriormente como práctica en los cursos de Química Analítica.

OBJETIVO SOCIAL

Establecer un método por cromatografía de gases capilar para determinar la calidad de diferentes variedades de aceite de oliva con el fin de evitar la intoxicación y el daño económico de los consumidores por este producto.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- Seleccionar la técnica de derivatización adecuada para aumentar la volatilidad de los principales ácidos grasos presentes en el aceite de oliva etiquetado como extra virgen, con el fin de hacer factible su análisis por cromatografía de gases capilar.
- Establecer las condiciones cromatográficas adecuadas (programa de temperatura, flujo, fase estacionaria, longitud y diámetro de la columna, etc.) para lograr la resolución de los ácidos grasos y la identificación y determinación de los mismos, en tres tipos de aceite de oliva denominados como extra virgen.
- Establecer una relación entre la composición y el origen del aceite a través de los resultados experimentales por medio de la comparación estadística de sus variancias y medias.
- Establecer una correlación entre la composición de los ácidos grasos y el origen del aceite de oliva para determinar su calidad.

HIPÓTESIS:

Tomando en cuenta las propiedades fisicoquímicas de los ácidos grasos característicos del aceite de oliva, será posible (previa derivatización) establecer un método para la separación y cuantificación de estos ácidos por cromatografía de gases capilar que sea rápido y de bajo costo y que permita detectar la calidad de este aceite.

GENERALIDADES

1.1 ACEITE DE OLIVA

La palabra aceite deriva del nombre árabe *az-zait*, que significa 'jugo de oliva'. Se le denomina al zumo o jugo oleoso extraído por prensado en frío de la aceituna, fruto del olivo; es de color dorado o verdoso, denso y de aroma perfumado. El aceite de oliva, rico en ácido oleico (monoinsaturado) y pobre en linoleico y linolénico (poliinsaturados), hace que disminuyan los niveles de colesterol de baja densidad (LDL-colesterol) de las personas que lo consumen y aumenta los niveles de colesterol de alta densidad (HDL-colesterol). Posee antioxidantes naturales por su contenido en alfa-tocoferol (vitamina E) y en polifenoles, cuyo componente principal es el tirosol. Su color dorado verdoso se debe a los residuos de clorofila y pigmentos carotenoides.

Se han descrito muchas propiedades dietéticas: contribuye a la regulación de la glucosa en la sangre, disminuye la tensión arterial, regulariza el funcionamiento del aparato circulatorio, mejora la absorción intestinal de los nutrientes y estimula el crecimiento óseo; además, es vehículo para la absorción de las vitaminas liposolubles (A, D, E, K). El aceite de oliva se ha convertido en el estandarte de la revitalizada "dieta mediterránea", dieta que se considera una de las más recomendables. El clima suave y la tierra cálida que rodea el mar Mediterráneo proporcionan una gran variedad de productos base de una dieta equilibrada: frutas, verduras, hortalizas, legumbres, pescado, vino, especialmente el vino tinto, y aceite de oliva, tanto en crudo como en guisos y frituras.

1.2 COMPOSICIÓN

El aceite de oliva es un compuesto complejo formado de ácidos grasos, vitaminas, componentes volátiles, componentes solubles en agua y proporciones microscópicas de aceituna.

Los componentes químicos del aceite de oliva pueden integrarse en dos grupos: fracción saponificable y fracción insaponificable. La primera está constituida por triglicéridos (ésteres de ácidos grasos y glicerina) y ácidos grasos libres. Entre los ácidos grasos más abundantes se encuentra el ácido monosaturado oleico y en menor proporción los ácidos poliinsaturados linoléico y linolénico. La fracción insaponificable está integrada fundamentalmente por terpenos y compuestos esteroídicos.[10]

Entre los terpenos se encuentra el escualeno. Los carotenos suponen de 0.5 a 10 mg/kg y constituyen el factor pro vitamina A del aceite, siendo los responsables junto con la clorofila de la coloración verde-amarilla de éste. El contenido de clorofila oscila entre 0 a 9.7 ppm, por lo que el aceite se oxida muy fácilmente y es muy sensible a la luz. El contenido de alfa-tocoferol representa el 90 al 95% de los tocoferoles totales y es el más activo, por su acción como vitamina E. Entre los esteroides destaca el beta-sitosterol que representa el 93%, pero su contenido varía en función del grado de maduración de la aceituna y su contenido en aceite. Este último componente interfiere competitivamente en la absorción intestinal del colesterol. Otros componentes del aceite de oliva son los compuestos fenólicos, que influyen en su calidad, especialmente en la estabilidad frente a la auto oxidación y en sus propiedades organolépticas. Su contenido depende de la variedad, grado de maduración, técnica de elaboración y manejo de la aceituna.

Por último, existen numerosos compuestos volátiles responsables del aroma especial que tiene este aceite (alcoholes, cetonas, ésteres, etc.). La Tabla 1 nos muestra las especificaciones de las principales propiedades físicas del aceite de oliva.

Tabla 1. Propiedades físicas del aceite de oliva

Parámetro	Especificación
Densidad o gravedad específica	0.9150 – 0.980 a 15.5°C
Viscosidad	84 mpa.s. 84 cp a 20°C
Calor específico	2.0 j / (g)(°C) ó .47BTU/(Lb)(°F)
Constante dieléctrica	3.1 a 20°C
Densidad a 20°C	920 Kg/m ³ , 7.8 Lbs/m ³ , 7.8Lbs/USgal
Capacidad calorífica volumétrica	1.650 (10)6j/m ³ a 20°C
Difusibilidad térmica a 20°C	10 X 10 ⁻⁸ m ² /seg.
Punto de ebullición	570 °F
Calorías por cucharada	120 aproximadamente

1.3 ÁCIDOS GRASOS

Los aceites están constituidos por ácidos grasos. Los ácidos grasos son moléculas largas de carbono que contienen el grupo $-\text{COOH}$. Los principales ácidos grasos presentes en el aceite de oliva son el oleico y el linoleico, con una pequeña cantidad de ácido linolénico. La fórmula de un ácido graso es: $\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_n \text{COOH}$. Si no existe un doble enlace presente, la molécula es llamada ácido graso saturado. Si la cadena contiene dobles enlaces es llamado un ácido graso insaturado. Un sólo enlace forma un ácido graso monosaturado. Los aceites con más de un doble enlace son llamados ácidos grasos poliinsaturados. Los ácidos grasos que poseen una o más insaturaciones tienen un punto de fusión más bajo que aquellos que están saturados, por lo cual son líquidos a temperatura ambiente. Los ácidos grasos poseen una porción hidrofílica y una porción hidrofóbica. Su porción hidrofóbica es más grande que la hidrofílica y presentan baja o ninguna solubilidad en agua. Los ácidos grasos presentan baja polaridad, al igual que los disolventes orgánicos como el hexano.

El aceite de oliva es un triacilglicérido: tres unidades de ácido graso unidos a una molécula de glicerol.

1.3.1 Propiedades de los principales ácidos grasos presentes en el aceite de oliva

1.3.1.1 Ácido Oleico

El ácido oleico (Figura 1) conforma de 55 a 85% del aceite de oliva y en la tabla 2 se muestran sus principales características.

Tabla 2. Características del ácido oleico

Fórmula	$\text{C}_{17}\text{H}_{35}\text{COOH}$
Densidad	0.895 g/ml
Punto fusión	4°C
Punto ebullición	286°C
Soluble	etanol, benceno, cloroformo y éter etílico

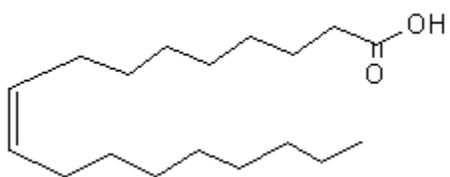


Figura 1

1.3.1.2 Ácido Linoléico

El ácido linoléico (Figura 2) es poliinsaturado y conforma hasta el 10% del aceite de oliva, en la Tabla 3 se muestran sus características principales.

Tabla 3. Características del ácido linoléico

Fórmula	$C_{17}H_{31}COOH$
Densidad	0.914 g/ml
Punto ebullición	230-232°C
Solubilidad	Solventes orgánicos

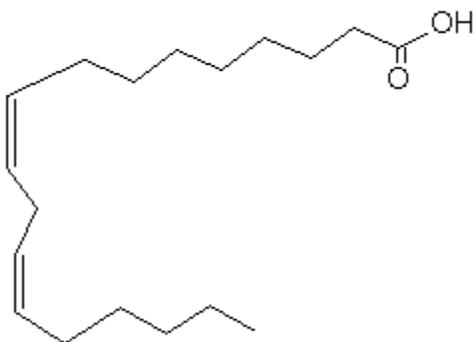


Figura 2

1.3.1.3 Ácido Linolénico

El ácido linolénico (Figura 3) es poliinsaturado y conforma de 0 a 1.5 % del aceite de oliva, en la Tabla 4 se muestran sus principales características.

Tabla 4. Características del ácido linolénico

Fórmula	$C_{17}H_{29}COOH$
Densidad	0.895 g/ml
Punto ebullición	182°C
Soluble	solventes orgánicos

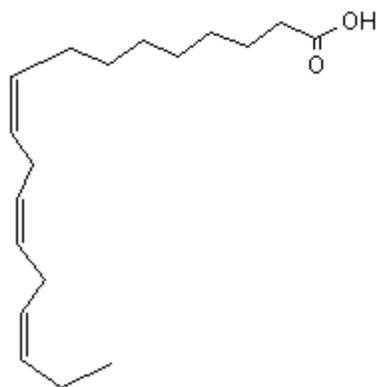


Figura 3

1.4 ELABORACIÓN DEL ACEITE DE OLIVA

El proceso de elaboración del aceite de oliva, comprende cuatro fases:

- I. **Recolección.** Esta fase consiste en recoger las aceitunas del olivo en el momento en que éstas hayan alcanzado el grado de madurez adecuado.

- II. **Molturación.** Las instalaciones tradicionales en las que se extrae el aceite de oliva reciben el nombre de almazaras, nombre procedente del árabe (*al-mas'sara*) que significa 'extraer', 'exprimir'. Recolectada la aceituna, se traslada a la almazara o molino en donde se criba y se lava con agua fría para eliminar hojas e impurezas. Posteriormente es almacenada en pequeñas pilas a la espera de ser molida.

Para obtener un aceite de calidad la aceituna debe procesarse en las 24 horas siguientes a su recolección. Se procede a molerla en un mortero o molino de rulo, donde se tritura para romper los tejidos en los que se encuentra el aceite, pero sin romper el hueso. La pasta que resulta, se prensa envolviéndola en capazos redondos de esparto, que actúan como desagües, filtrando los líquidos y reteniendo los sólidos. El líquido, transvasado de una a otra tinaja, se decanta, por lo que libera al aceite de las sustancias que tenga en suspensión.

Existe otro procedimiento en lugar del prensado en el que la pasta se bate y centrifuga por procedimientos mecánicos, sin añadir productos químicos ni calor, separando el aceite del resto de las sustancias. El molido y prensado de las aceitunas para la extracción del aceite de oliva virgen se realiza exclusivamente a través de procedimientos mecánicos o físicos. La pasta que resta es aún rica en aceite y se exprime de nuevo hasta tres veces más. Los residuos se conocen con el nombre de orujo. El aceite de la primera presión es el más valorado, y según se va exprimiendo de nuevo se obtienen aceites de diferentes calidades. Para obtener un litro de aceite de primera extracción se necesitan unos cinco kilos de aceitunas. El consumo durante el primer año asegura que sus cualidades estén intactas. Estos aceites se conocen con el nombre genérico de aceite de oliva virgen.

La acidez de un aceite de oliva viene determinada por su contenido en ácidos grasos libres y se expresa por los gramos de ácido oleico por cada 100 gramos de aceite. Estos

grados no tienen relación con la intensidad del sabor, sino que son una pauta para catalogar los aceites de oliva.

Un aceite de oliva virgen que por su olor y sabor resulte defectuoso así como por tener una acidez superior a 3.3°, se conoce como aceite lampante; este nombre hace referencia al empleo que se hacía de él hasta hace pocos años, ya que se usaba para la iluminación con lámparas. Una vez refinado y casi desprovistos de sabor, olor y color se enriquecen con aceites de oliva vírgenes aromáticos y afrutados (esta operación se denomina encabezar) siendo así aptos para el consumo, y se conocen como aceite de oliva refinado.

Los restos sólidos (una especie de pasta) son conocidos como orujo, y los líquidos, denominados alpechín, procedentes de la extracción del aceite de oliva, son aprovechados como combustibles o como abonos orgánicos.

La obtención del aceite que aún permanece en el producto secundario sólido (orujo) que se obtiene después de la molturación y prensado de la aceituna, es llamada extracción de aceite de orujo.

- III. **Refinado.** Los procesos químico y físico de refinado a los que se someten los aceites de oliva vírgenes, que por sus características organolépticas y de acidez no son aptos para el consumo, así como los crudos de orujo. El refinado no afecta su valor energético, pero sí su valor biológico, ya que durante este proceso se forman compuestos derivados responsables del efecto nocivo para el hombre.
- IV. **Envasado** En esta última fase los aceites son etiquetados y envasados en los diferentes contenedores.

1.5 DEFINICIONES Y DENOMINACIONES DE LOS ACEITES DE OLIVA

1.5.1 Tipos de aceites de oliva.

La legislación de la Unión Europea ha establecido en el Convenio Internacional del Aceite de Oliva del año 1986 la denominación de “aceite de oliva” únicamente al aceite procedente del fruto del olivo, con exclusión de aquellos obtenidos por disolventes o mediante mezcla con aceites de otra naturaleza distinta. Esta denominación tampoco es aplicable al aceite obtenido del orujo de la aceituna.

La legislación distingue los siguiente tipos de aceite de oliva para su comercialización:

1.5.1.1. Aceites de oliva vírgenes.

Los aceites obtenidos a partir del fruto del olivo únicamente por procedimientos mecánicos u otros procedimientos físicos, en condiciones sobre todo térmicas, que no ocasionen la alteración del aceite, y que los frutos no hayan sufrido tratamiento alguno distinto del lavado, la decantación, el centrifugado y la filtración, con exclusión de los aceites obtenidos mediante disolvente o por procedimiento de reesterificación y de cualquier mezcla con aceites de otra naturaleza. Se trata de obtener el “zumo” de la aceituna de forma natural, conservando todo el sabor y las vitaminas del fruto.

Estos aceites serán objeto de la clasificación y de las denominaciones siguientes:

a) Aceite de oliva virgen extra: aceite de oliva virgen con una acidez libre, expresada en ácido oleico, como máximo de 0.8 g por 100 g (acidez menor o igual a 0.8 grados).

Dentro del aceite de oliva virgen extra, podemos distinguir 3 tipos:

- 1) Monovarietal: Aquél que se obtiene a partir de una sola variedad de aceituna
- 2) Coupages: Aquél que se obtiene a partir de diversas variedades de aceituna.
- 3) D.O.P. (Denominación de Origen Protegida): Aquél que se obtiene a partir de aceitunas procedentes de un área geográfica concreta. El aceite debe ser también elaborado y embotellado en esa área, estar sometido a ciertos controles y la D.O.P. debe estar oficialmente reconocida.

- a) Aceite de oliva virgen: aceite de oliva virgen con una acidez libre, expresada en ácido oleico, como máximo de 2 g por 100 g (acidez menor o igual a 2 grados).
- b) Aceite de oliva lampante: Denominado así porque en la antigüedad era el que se empleaba para las lámparas de aceite que iluminaban los hogares. Es un aceite de oliva virgen con una acidez libre, expresada en ácido oleico, superior a 2 grados.

La legislación vigente no permite el envasado de aceite de oliva virgen que por sus características organolépticas, o su grado de acidez no se pueda incluir dentro de las denominaciones de aceite de oliva virgen extra o aceite de oliva virgen.

1.5.1.2 Aceite de oliva refinado

Aceite de oliva obtenido mediante el refinado de aceites de oliva vírgenes, cuya acidez libre, expresada en ácido oleico, no podrá ser superior a 0.3 g por 100 g (acidez inferior a 0.3 grados). Es bastante habitual, que proceda de aceite de oliva lampante que no puede envasarse para consumo humano por su elevada acidez, pero que tras pasar por este proceso de refinación química, se logra disminuir la acidez por debajo de 0.3º y puede envasarse y distribuirse sin ningún problema.

1.5.1.3 Aceite de oliva compuesto exclusivamente por aceites de oliva refinados y aceites de oliva vírgenes

Aceite de oliva constituido por una mezcla de aceite de oliva refinado y de aceites de oliva vírgenes distintos del aceite lampante, cuya acidez libre, expresada en ácido oleico, no podrá ser superior a 1 g por 100 g (acidez no superior a 1º) y cuyas otras características son conformes a las establecidas para esta categoría. Este es el aceite de oliva que se puede comprar a un precio menor (aunque en los últimos tiempos, la diferencia de precio con el aceite de oliva virgen es menor) y es el que más se vende en España.

1.5.1.4 Aceite de orujo de oliva crudo

Aceite obtenido mediante tratamiento por disolvente del orujo de oliva, con exclusión de los aceites obtenidos por procedimientos de reesterificación y de cualquier mezcla con aceites de otra naturaleza y cuyas otras características son conformes a las establecidas para esta categoría.

1.5.1.5 Aceite de orujo de oliva refinado

Aceite obtenido mediante refinado de aceite de orujo de oliva crudo, cuya acidez libre, expresada en ácido oleico, no podrá ser superior a 0.3 g por 100 g (acidez no superior a 0.3°).

1.5.1.6. Aceite de orujo de oliva

Aceite constituido por una mezcla de aceite de orujo de oliva refinado y de aceites de oliva vírgenes distintos del lampante, cuya acidez libre, expresada en ácido oleico, no podrá ser superior a 1 g por 100 g (acidez no superior a 1°).

1.6 CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS

La cata del aceite de oliva constituye una verdadera especialidad. Los catadores, mediante la vista, el olfato, el gusto y el tacto, son capaces de distinguir sus calidades y variedades. Las características organolépticas del aceite de oliva, como son color, olor y sabor, dependen esencialmente de los componentes presentes en la aceituna, que se extraen junto con el aceite que los contiene, y que vienen determinados por el clima y el suelo de cultivo, por la variedad de la aceituna, y por las técnicas de cultivo, recolección, extracción y envasado.

Existe la tendencia a creer que los aceites de oliva virgen extra con menor grado de acidez son de mejor calidad que los aceites de oliva virgen extra con mayor grado de acidez. Esto no es correcto. Cualquier aceite de oliva de la categoría virgen extra posee una calidad excepcional y tiene unos tonos afrutados increíbles, un ligero toque amargo, etc. Aquí el grado de acidez tiene más que ver con la intensidad del sabor; así un aceite de 0.8 grados tendrá un sabor más intenso que un aceite de 0.1 grados.

Los principales productores de aceite de oliva son España, Italia y Grecia. El olivo fue una de las primeras plantas introducidas por los españoles en América, primero en las Antillas y, después, en México, Perú, Argentina y California.

1.7 PARÁMETROS QUE DEFINEN LA CATEGORÍA DE UN ACEITE DE OLIVA VIRGEN:

1.7.1 Grado ó índice de acidez

Es un indicador de la cantidad de ácidos grasos libres presentes en el aceite, expresada en tanto por ciento de ácido oleico. Los ácidos grasos se liberan cuando la aceituna es defectuosa por causa de una plaga o enfermedad o bien se ha maltratado durante la recolección y/o transporte por lo tanto un mayor grado de acidez, significa mayor deterioro de las aceitunas. El valor máximo admitido por la Reglamentación Técnico- Sanitaria apto para el consumo humano es de 3.3 por cada 100 gramos de ácidos grasos.

1.7.2 Índice de peróxidos

Mide el estado de oxidación inicial de un aceite y se expresa en miliequivalentes de oxígeno activo por kilo de grasa. El valor limitante para el consumo es de 20. Los peróxidos o compuestos de oxidación inicial se originan si la aceituna se maltrata, si el aceite no se protege de la luz y el calor o no se guarda en envases adecuados; como consecuencia de ello, a mayor índice de peróxidos menor será la capacidad antioxidante de un aceite.

La absorbancia o medida espectrofotométrica en el ultravioleta (UV): es indicadora de la presencia de compuestos de oxidación complejos distintos a los peróxidos. Se expresa mediante el coeficiente conocido como K_{270} . Estos se originan por una mala conservación o por modificaciones inducidas por los procesos tecnológicos; por lo tanto, a mayor K_{270} menor será la capacidad antioxidante de un aceite. El valor limitante establecido es de 0.25.

1.7.3 Valoración organoléptica.

Es la prueba decisiva, pero no la única, para la asignación de la categoría de un aceite virgen y la clasificación del mismo.

1.8 CROMATOGRAFÍA

La cromatografía es una técnica de separación de los componentes o solutos de una mezcla, sobre la base de una distribución de cantidades relativas de cada soluto entre una fase móvil y una fase estacionaria en contacto íntimo entre sí.

La base de la separación es la diferencia de velocidades de migración de los solutos, regida por la afinidad de éste por la fase estacionaria.

1.8.1 Cromatografía de gases.

La cromatografía de gases (CG), es un método analítico de separación de compuestos térmicamente estables, volátiles o semivolátiles, que se basa en la diferencia de afinidad de cada componente de la mezcla por la fase estacionaria. Esto provoca que los componentes de la mezcla a separar avancen con velocidades relativas diferentes a través del sistema al ser arrastrados por la fase móvil gaseosa [11-12] .

La fase estacionaria se encuentra distribuida en el interior de un tubo de acero inoxidable o sílice fundida. La mezcla se introduce en un dispositivo de inyección donde es vaporizada, para posteriormente ser transportada a la columna por la fase móvil. A la salida de la columna un detector señala la presencia, cantidad y grado de separación obtenido entre los analitos. Del proceso cromatográfico en el detector se obtiene un cromatograma.

Se pueden separar diversos tipos de compuestos por este tipo de cromatografía:

1. Compuestos térmicamente estables.
2. Compuestos volátiles o semivolátiles.
3. Compuestos que por medio de formación de derivados se transformen en los anteriores.

Generalmente se trata de compuestos orgánicos de bajo peso molecular ($PM \leq 300$).

De forma general la cromatografía de gases es aplicable para separar y analizar mezclas cuyos constituyentes tengan puntos de ebullición de más de 300°C y que sean térmicamente estables.

1.8.2 Instrumentación

Los componentes básicos de un cromatógrafo de gases se muestran en la Figura 4.

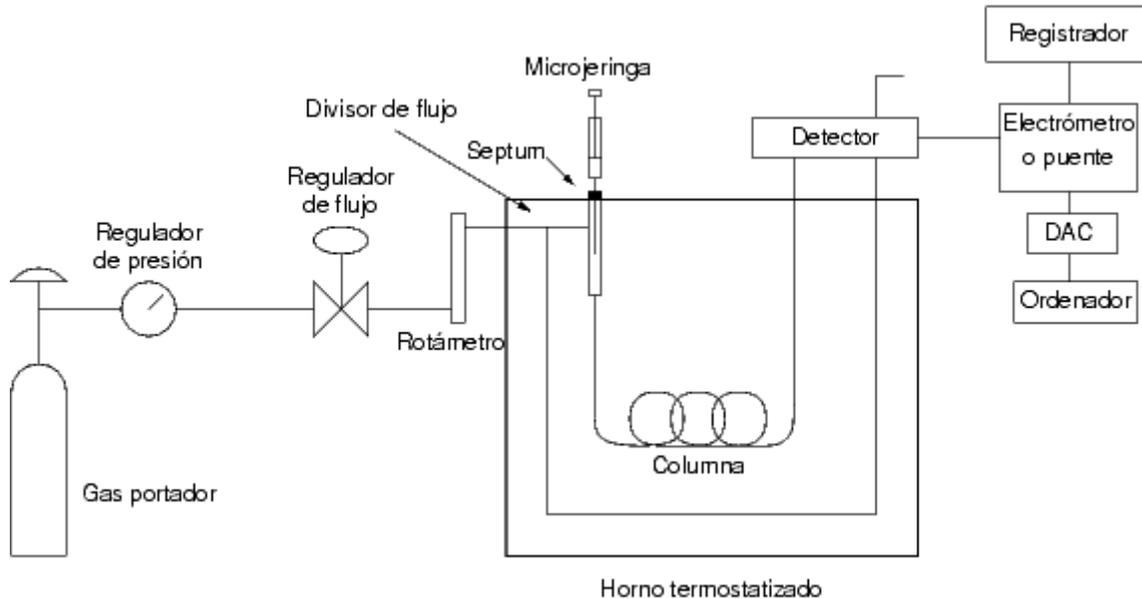


Figura 4 Instrumentación de la Cromatografía de Gas-líquido (CGL)

1.8.2.1. Gas portador o acarreador.

La misión del gas portador es llevar o transportar la mezcla de solutos desde que se introducen en el sistema cromatográfico hasta la salida del detector, pasando a través de la columna donde se produce la separación. Generalmente el gas portador o acarreador (fase móvil, gas vector, de arrastre o transportador) se obtiene de tanques comerciales a alta presión. Entre los gases portadores, se encuentra el helio, el nitrógeno y el hidrógeno. La elección de estos depende de las siguientes características:[12]

- Pureza: el gas portador debe de estar lo suficientemente puro para no producir ruido de fondo en la señal registrada y así obtener resultados reproducibles.
- Viscosidad: se requiere el uso de un gas poco viscoso para no tener que aplicar fuertes presiones a la entrada de la columna.
- Peso molecular: es conveniente el uso de un gas de peso molecular alto porque en éste, los solutos difunden menos, lo que puede ser importante para que los picos sean más angostos.

La fase móvil no interacciona con la muestra, sólo la conduce a través de la columna por lo que usualmente se denomina como gas de arrastre. Uno de los requisitos de éste es que debe ser inerte (no debe reaccionar con la muestra, fase estacionaria y superficies

del instrumento), y puro (exento de impurezas que puedan degradar la fase estacionaria o la muestra).

1.8.3 Introducción de la muestra.

Los principales dispositivos de inyección de la muestra implican el uso de una microjeringa para inyectar una muestra líquida, sólida o gaseosa a través de un diafragma o septum en una cámara de vaporización instantánea. El tamaño de la muestra varía desde unas pocas décimas de microlitro a 20 μL . Las columnas capilares exigen cantidad de muestra mucho menores (aproximadamente $10^{-3} \mu\text{L}$)[12-14]

1.8.4 Tipos de inyectores

El inyector tiene que vaporizar y mezclar la muestra con el gas portador antes de que ingrese en la cabeza de la columna. La inyección es un aspecto muy importante para que la separación que se lleve a cabo sea considerada de calidad.

Existen diferentes formas de inyección y diferentes tipos de inyectores, los cuales dependen del tipo de columna que se utilice en los análisis, por lo que es necesario mencionar cuales son los tipos de inyectores que existen.

1.8.4.1. Inyección de vaporización directa

Este tipo de inyección se utiliza como un camino muy simple para la introducción de la muestra, cuando las columnas que se utilizan son las columnas empacadas o las Megaboro de 530 μm donde usualmente se utiliza un flujo de 10 ml/min.[14]

Todos los modelos de este tipo de inyector son una variación de un montaje muy simple en donde se utiliza un tubo de metal el cual tiene por dentro una cubierta de vidrio. Por esta cubierta se hace pasar el gas acarreador y se calienta hasta llegar a la temperatura de vaporización del analito; posteriormente, ya vaporizada, pasa a la columna para que se lleve a cabo la separación. En un extremo del inyector se encuentra el septum, el cual permite que la aguja sea introducida al sistema mientras que por el otro lado se conecta a la cabeza de la columna. [14] Lo más importante y sobresaliente de este tipo de inyector es que toda la muestra que se inyecta pasa a la columna para ser analizada.

1.8.4.2 Inyector *split/splitless*

En las columnas capilares, se pueden utilizar proporciones de flujos pequeños, pero aún cuando éstos sean pequeños pueden saturar la columna. Existen inyectorios que pueden trabajar en dos modos, con o sin división de flujo conocidos como *split/splitless* [14]

El modo *split* (inyección dividida) es una forma de reducir el volumen de muestra para las columnas tubulares abiertas (capilares). Sólo 0.1 al 10% del volumen de 0.1 a 2 μ L de muestra inyectada llega a la columna, el resto se elimina. La muestra se inyecta a través del septum en la zona de vaporización de la muestra. La válvula se cierra, después el gas portador transporta la muestra hacia la vaporización.

En el punto de división, parte de la muestra entra a la columna cromatográfica y el resto pasa a una válvula, hacia la salida de desechos. Durante la inyección la muestra puede fraccionarse si alguno de los componentes no se vaporiza del todo, lo que causa errores en el análisis cuantitativo. Si la temperatura del inyector es demasiado elevada puede ocurrir descomposición, con pérdida de algunos componentes y la formación de otros nuevos que no existían en la muestra original. La relación de *split* varía entre 1:20 y 1:500. [11]

Por otro lado el modo *splitless* (inyección sin división) se utiliza cuando se trabajan muestras muy diluidas. En este modo la inyección se realiza lentamente. La temperatura inicial de la columna es 20° a 25°C menor que la temperatura de ebullición del solvente, que de este modo se condensa al principio de la columna. Este efecto provoca que los picos sean más estrechos. En este tipo de inyección la mayor parte de la muestra (hasta 80%) se aplica a la columna. [11,14]

1.8.4.3 Inyector *on-column*

En este tipo de inyector, la muestra es inyectada directamente en la columna y la vaporización ocurre después de la inyección. Este tipo de inyección requiere una microjeringa muy especial, la aguja (de acero o silicón) tiene un diámetro aproximado de 0.15 mm y penetra en la columna o la precolumna, guardando 4°C antes de aumentarla a la temperatura de operación. Este acercamiento, el cual es muy difícil de realizar sin la ayuda de un automuestrador, es muy usado para compuestos térmicamente inestables (utilizados en bioquímica) y es conocido por no discriminar compuestos de diferentes volatilidades.[14,15]

1.8.5 Columnas.

La columna es el elemento esencial del cromatógrafo de gases, ya que en ésta tienen lugar los procesos fisicoquímicos en los que se fundamenta la separación, adquiriendo los solutos diferentes movilidades según sus valores relativos de volatilidad-solubilidad (CGL) ó volatilidad-adsorción (CGS), según se base la separación en fenómenos de partición o de adsorción.

Existen tres tipos de columnas para la cromatografía de gases: Las columnas empacadas, las columnas capilares y las columnas Megaboro "350", las cuales tienen 350 µm de diámetro.

1.8.5.1 Columnas empacadas.

Las columnas empacadas están hechas de acero o vidrio, tienen un diámetro de 3 a 6 mm y tienen un intervalo de longitud de 1 a 3 m. La superficie interna del tubo es tratada para evitar las interacciones catalíticas con la muestra; el flujo que se utiliza para este tipo de columnas es de 10 a 40 mL/min de gas acarreador.[14]

Las columnas empacadas contienen un soporte poroso estable e inerte en donde se impregna la fase estacionaria. El soporte sólido es hecho de esferas aproximadamente de 0.2 mm de diámetro, obtenidas de diatomitas fósiles de silicato, el cual es comparado químicamente con la sílica amorfa.[13,14]

Este tipo de columnas ya no son muy utilizadas debido a que han sido reemplazadas en su mayoría por las columnas capilares.

1.8.5.2 Columnas capilares.

Son las más utilizadas actualmente en Cromatografía de Gases. Las columnas capilares son comúnmente preparadas de sílica fundida de alta pureza obtenida de la combustión de SiH_4 ó SiCl_4 en una atmósfera rica de oxígeno. El diámetro interno varía desde 0.1 a 0.35 mm y una longitud de 15 a 100 m. Las columnas capilares son revestidas usualmente con poliimida o con una capa de alúmina. La poliimida protege a la columna química y mecánicamente. La superficie internan de sílica es tratada usualmente, dependiendo de la técnica usada para enlazar a la fase estacionaria.

En este tipo de columnas la fase estacionaria es retenida sobre la pared interna de la columna. Según se realice esta retención, pueden distinguirse dos tipos de columnas capilares:[14]

a) Columnas abiertas con la pared recubierta (WCOT) (*Wall-Coated Open Tubular Columns*), en las que la fase estacionaria esta directamente depositada en la pared de la columna sin que exista ningún aditivo que pueda considerarse un soporte.

b) Columnas abiertas con capa porosa (PLOT) (*Porous-Layer Open Tubular Columns*), en las que la pared interna de la columna es una superficie porosa donde queda retenida la fase estacionaria.

Las columnas PLOT, debido a su carácter rugoso, tienen una mayor capacidad de muestra que las WCOT, con una eficacia y resolución intermedias entre éstas y las columnas empaquetadas.

La relación de fases es más baja en las WCOT, siendo especialmente útiles para la separación de compuestos orgánicos volátiles a temperatura por encima de la del ambiente.

1.9 DERIVATIZACIÓN

La derivatización en química analítica se emplea por dos razones: [16]

1. Para permitir el análisis de compuestos que no es posible analizar directamente debido, por ejemplo, a su inadecuada volatilidad ó estabilidad.
2. Para mejorar el análisis al mejorar el comportamiento cromatográfico ó la detectabilidad del analito.

La razón más importante para emplear la derivatización en el análisis por cromatografía de gases es para impartir volatilidad a compuestos no volátiles. La baja volatilidad de un compuesto puede ser debida al tamaño de las moléculas y a las grandes fuerzas de dispersión resultantes. En moléculas pequeñas la baja volatilidad puede ser resultado de las fuertes atracciones intermoleculares entre grupos polares, por lo que el enmascaramiento de los grupos polares al derivatizar produce un dramático incremento en la volatilidad.

En otros casos, la excesiva volatilidad es un problema (como en el caso de las aminas de muy bajo peso molecular) entonces la derivatización química puede ser usada para producir derivados menos volátiles y minimizar perdidas por la manipulación y de esta manera ayudar a separar la muestras del solvente mediante cromatografía de gases. También algunos compuestos volátiles muy sensibles sufren descomposición térmica en el cromatógrafo de gases, por lo que la derivatización puede ser usada para formar compuestos más estables y de esta manera mejorar el comportamiento cromatográfico.

Los picos asimétricos en un cromatograma pueden ser el resultado de efectos de adsorción en la columna, las muestras polares tienden a adsorberse en las superficies de las paredes de la columna y del soporte sólido. La reducción de estos efectos de adsorción se encuentra en gran proporción en la aplicación de derivatización en el análisis cromatográfico. En compuestos cercanos difíciles de separar, se puede mejorar la separación mediante el uso del derivado apropiado

1.10 CURVA DE CALIBRACIÓN CON ESTÁNDAR INTERNO

Una parte importante en la determinación cromatográfica de un compuesto es la obtención de la curva de calibración. La curva de calibración se obtiene al representar gráficamente el área bajo la curva obtenida en función de la concentración conocida. Como es deseable, la gráfica debe tender a una línea recta. Sin embargo, debido a los errores indeterminados en el proceso de medida, no todos los datos tienen un comportamiento lineal a causa del error indeterminado. La relación matemática que describe esta suposición se denomina regresión lineal por mínimos cuadrados y se representa como: $Y = mx + b$, donde b es la ordenada en el origen (el valor de Y cuando x es cero) y m es la pendiente de la recta. La determinación de la concentración del analito de interés se realiza a través de la interpolación de la señal de éste en la curva de calibración.

En cromatografía las condiciones varían en un mínimo en cada experimento; sin embargo, el volumen en la inyección es la principal fuente de error en los análisis por CG. La adición de un estándar interno (método de estándar interno) permite compensar este tipo de errores debido a que el uso de este estándar interno tiende a reducir las imprecisiones que surgen por introducción de la muestra puesto que se grafica un cociente de áreas, logrando máxima precisión, ya que se minimizan las incertidumbres en inyecciones manuales de la muestra. [11,13].

En este procedimiento se introduce una cantidad cuidadosamente medida de un estándar interno en cada muestra y se usa como parámetro analítico la proporción del área del pico del analito (o su altura) sobre el área del pico de estándar interno (o su altura). Para que este método tenga éxito, es necesario que el pico del patrón interno este bien separado de los picos de los demás componentes de la muestra. Sin embargo, debe ser cercano al pico del analito, y no debe formar parte de la muestra que se analiza.

DESARROLLO EXPERIMENTAL

En la realización de la parte experimental se utilizó el siguiente equipo y material:

2.1 Equipo y material de laboratorio.

Cromatógrafo de Gases Varian 3800

Columna: DB WAX (polietilenglicol)

Dimensiones 30 m. X 0.32 mm D.I; 0.25 μ m espesor de película.

Balanza analítica marca: Mettler Toledo, modelo AB204 (\pm 1mg)

Estufa marca Mettler

10 viales de reacción. ,

Microjeringa de 10 μ L

Pipetas volumétricas de 1mL, 2mL, 5mL.

Propipetas

Piseta con agua destilada

Embudo de separación

Matraces volumétricos de 5mL, 10mL y 25 mL.

Pipetas Pasteur

Embudo de vidrio

Vasos de precipitado de 20mL, 50mL, 100mL, 250mL.

Agitador de vidrio

2.2 Reactivos

Hidróxido de potasio (KOH); marca Baker

Alcohol metílico (CH₃OH) ; marca Baker

Bicarbonato de sodio (Na₂HCO₃) pureza 99.7%

Ácido clorhídrico (HCl); marca Baker, pureza 37%

n-Hexano (C₆H₁₄). Marca Prolabo: *Chromanorm for HPLC*

Sulfato de sodio anhidro (Na₂SO₄) marca Baker, pureza 98.52%

Agua desionizada

Estándares de metil ésteres como:

Tabla 5. Estándares de esteres metílicos

Estándar	Marca	pureza
Metil ester de ácido oleico	Sigma	99%
Metil ester de ácido linoléico	Sigma	99%
Metil ester de ácido linolénico	Fluka	99%
Metil ester de ácido mirístico	Sigma	99%

2.3 Soluciones

La preparación de las soluciones para derivatización de las muestras se realizó de la siguiente manera:

Solución de hidróxido de potasio al 5% (p/v) en metanol.

Solución de HCl al 10% (v/v) en metanol.

Solución de bicarbonato de sodio al 5% (p/v) en agua.

Preparación de soluciones para la curva de calibración.

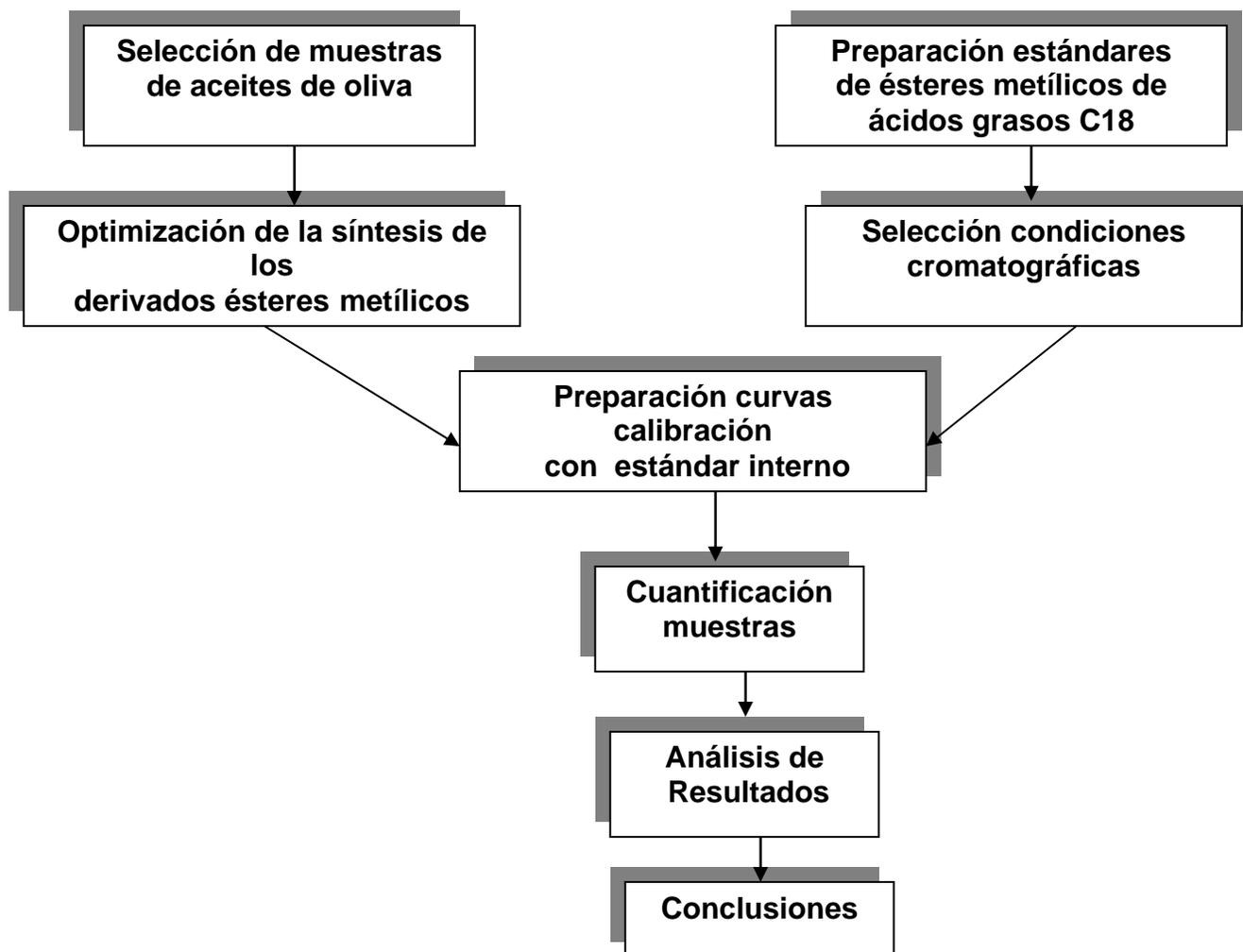
2.3.1 Solución de estándar de ácidos grasos

Se pesan aproximadamente 125 mg de cada estándar metil ester del ácido (oleico, linoléico, y linolénico) y se aforan en un matraz volumétrico de 5 mL con n-hexano. La concentración aproximada es de 25 mg/mL.

2.3.2 Solución de estándar Interno

Se pesan aproximadamente 750 mg del metil ester del ácido mirístico y se aforan en un matraz volumétrico de 50 mL con n-hexano. La concentración aproximada es de 15 mg/mL.

DIAGRAMA DE FLUJO



2.5 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

2.5.1 Preparación de estándares de ácidos grasos insaturados

Se pesan 20 mg de cada estándar por separado y se aforaron a 5 mL con n-hexano, de cada solución se inyecta 1 μ L en el cromatógrafo de gases en las condiciones seleccionadas.

2.5.2 Optimización de las condiciones cromatográficas

En la sección de química analítica se cuenta con un cromatógrafo de gases. En el inicio del trabajo de tesis se evaluó el comportamiento del sistema, con el fin de determinar el orden de elusión de algunos derivados metil ester de ácidos grasos se preparo una mezcla con los siguiente ácidos: caproico (C_6), cáprico (C_{10}), laúrico (C_{12}), mirístico (C_{14}), palmítico (C_{16}) y esteárico (C_{18}) todos ellos saturados; además de los ácidos oleico, linoléico y linolénico (C_{18}) (insaturados). Para este fin se ensayaron varios programas de temperatura hasta lograr dichas separaciones. Las condiciones cromatográficas y el Cromatograma de la separación se presenta en la Tabla 6 y Figura 5 respectivamente

Tabla 6. Condiciones cromatográficas iniciales

Parámetro	Especificación
Cromatógrafo gases	Back Scientific modelo 910
Columna	Megabore ZB-WAX, longitud 15m, DI=0.53, df=1.5 μ m
Programa Temperatura.	$T_{inicial}$ =70°C., 5 min., 4°C/min., T_{final} =240°C 15 min.
Flujo gas acarreador	Nitrógeno: 5 psi
Volumen de inyección	1 μ L manual.
Temperatura detector	FID 250°C

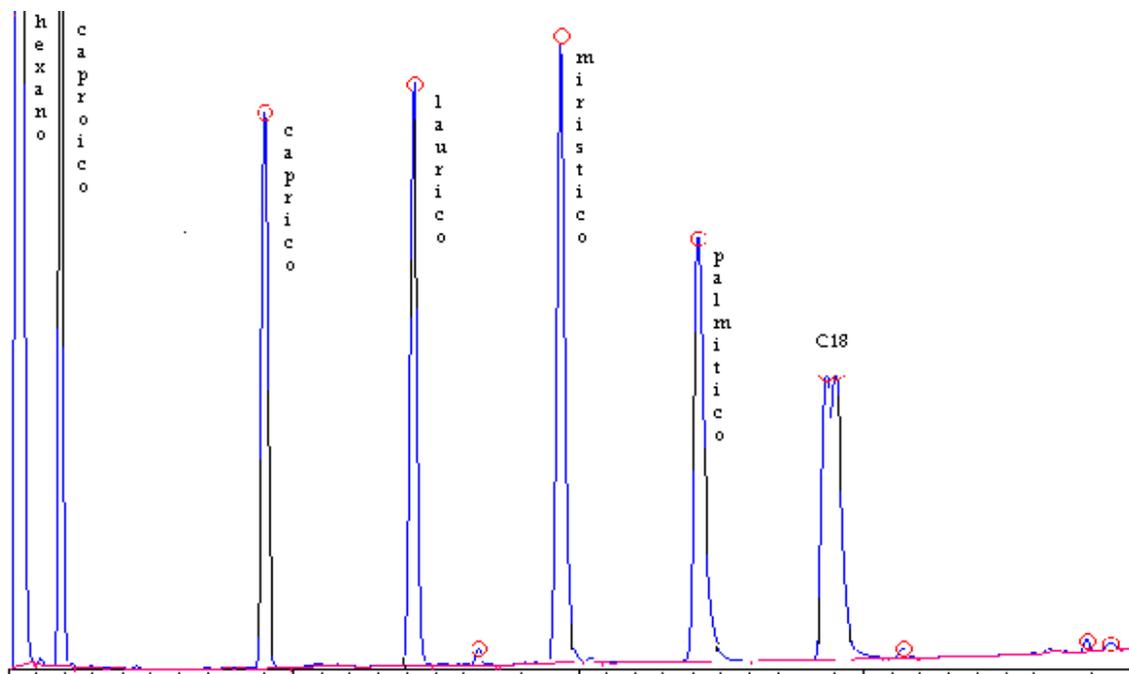


Figura 5 Separación de los ácidos grasos saturados: Caproico (C6), Cáprico (C10), Laúrico (C12), mirístico (C14), Palmítico (C16).

En el cromatograma obtenido en la Figura 5, se puede observar que la separación se lleva a cabo con una buena resolución para los compuestos saturados desde C₆ a C₁₆; sin embargo, para los isómeros de C₁₈ no es posible la separación. De acuerdo con este cromatograma, en la Tabla 7 se reportan los tiempos de retención obtenidos para cada ácido graso.

Tabla 7. Tiempos de retención de los ácidos grasos

ácido graso	T _R (min.)
Caproico	1.758
Cáprico	8.950
Laúrico	14.183
Mirístico	19.325
Palmítico	24.158

Las condiciones cromatográficas iniciales (ver Tabla 6) no permiten la separación de los ácidos grasos, C₁₈, característicos del aceite de oliva; en consecuencia, se debe adquirir una columna más eficiente (mayor N o DI menor) para lograr dicha separación.

2.5.3 Separación cromatográfica de los ácidos grasos

En este punto, se tuvo la oportunidad de usar otro equipo ubicado en la nave 2000 de ingeniería de alimentos, el cual presentó la ventaja de permitir el uso de columnas de diámetro interior más pequeño, con lo que se logró un incremento significativo de la eficiencia y por lo tanto la separación de los ácidos grasos insaturados (C₁₈), objeto de estudio en los aceites de oliva.

2.5.4 Preparación de la curva de calibración con estándar interno

- *Solución estándar del ácido graso:* se pesan 131 mg de estándar de metil ester de ácido linoléico, 141 mg de estándar de metil ester de ácido linolénico y 135 mg de estándar de metil ester de ácido oleico y se aforaron a 5 mL con n-hexano
- *Estándar interno:* se pesan 753 mg de ácido mirístico y se aforan a 50 mL de hexano.

Se prepara la curva de calibración de acuerdo con los volúmenes de la siguiente Tabla:

Tabla 8. Preparación de los sistemas para curva de calibración.

Sistema	solución estándar ácido (mL)	Solución estándar interno (mL)	Volumen aforo (mL)
1	0.2	1	5
2	0.4	1	5
3	0.6	1	5
5	1.0	1	5
6	1.2	1	5

Los sistemas se prepararon en pequeños viales, se taparon con teflón y se mantuvieron refrigerados hasta el momento de ser inyectados en el cromatógrafo de gases. Se inyectó 1 µL de cada sistema.

2.5.5 Muestras Analizadas

Las muestras analizadas fueron tres aceites de oliva de la variedad extra virgen, diferentes orígenes y marcas:

Tabla 9. Muestras analizadas

Nombre comercial	Origen	Calidad
“Carapelli”	Italiano	Extra virgen
“Hojiblanca”	Español	Extra virgen
“OleOleico”	Mexicano	Extra virgen

(*) Las etiquetas de las marcas comerciales de los aceites de oliva usados en el presente trabajo se pueden observar en el anexo 2, Pág. 55.

2.5.6 Optimización de las condiciones de derivatización.

Para el estudio por cromatografía de gases del aceite de oliva, se requiere considerar la volatilidad de los compuestos químicos de interés (ácidos grasos). Como el punto de ebullición de los principales ácidos grasos del aceite de oliva es superior a los 200°C y el punto de ebullición de un éster métilico de un ácido graso es en promedio menor a esta temperatura, las muestras de los aceites de oliva deben ser derivatizadas para aumentar su volatilidad.

Para la optimización de las condiciones de derivatización se consideraron varios factores tales como:

1. Las cantidades de muestra se ajustaron de acuerdo al contenido de los ácidos grasos en las muestras reales.
2. Se adecuaron las concentraciones y los volúmenes de los reactivos para optimizar el rendimiento de la reacción de derivatización.
3. El tiempo y la temperatura de reacción se variaron hasta lograr la derivatización con un rendimiento máximo.
4. Se realizaron ensayos con una y dos extracciones para lograr una recuperación máxima.

5. Se realizó un diseño y mandaron a hacer dos embudos de separación de una capacidad menor a los comerciales (aproximadamente de 15 y 20 mL) a fin de evitar pérdidas de producto durante la extracción.

Después de realizar todos los ensayos antes mencionados, se logró establecer una técnica de derivatización optimizada, cuyos pasos se describen a continuación:

- a. En un vial se pesan aproximadamente 40 mg si se va a determinar el ácido oleico y 125 mg si se va a determinar el ácido linoléico ó linolénico.
- b. Se agrega 1 mL de KOH al 5% en metanol. Se tapa con teflón y se coloca en la estufa durante una hora a 80°C.
- c. Se deja enfriar y se agregan 2 mL de HCl al 10% en metanol
- d. El vial se tapa con teflón y se calienta en la estufa durante una hora a 80°C.
- e. Se deja enfriar y se agregan 2 mL de agua, después se agrega poco a poco bicarbonato de sodio al 5% hasta neutralizar (conseguirlo con la ayuda de papel pH), agitando suavemente para evitar que se derrame (Vol. aproximado 1 mL).
- f. A la mezcla anterior se agregan 2 mL de n-hexano, se agita las dos fases con un vortex de 5 a 10 min. y se deja reposar.
- g. Se separa la fase de n-hexano, y se coloca la fase orgánica en un matraz aforado de 5 mL al que previamente se le ha adicionado 1 ml de solución de estándar interno. Finalmente se lleva al aforo con n-hexano; y se transvasa a un vial. En caso de que esta fase presente turbidez, se agregan unos granitos de sulfato de sodio anhidro para eliminar el agua. Los viales se sellan con teflón y se mantienen en refrigeración hasta el momento de la inyección.
- h. Se inyecta 1 μ L en el cromatógrafo de gases.

3 RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Las condiciones cromatográficas óptimas para la separación de los ácidos grasos C₁₈ por cromatografía de gases se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10. Condiciones cromatográficas para la separación de los ácidos grasos

Parámetro	Especificación
Equipo	Varian 3800
Columna	Polietilenglicol DB-WAX, L=30m, DI=0.32mm, df=0.25µm
Programa Temperatura	T ₁ :70°C ,1 min.; 4°C/min. ; T ₂ :240°C, 15 min.
Relación split	1 : 50
Flujo gas acarreador	Nitrógeno: 1.8 mL / min.
Temperatura inyector	250°C
Volumen inyección	1 µL manual.
Temperatura Detector	FID 250°C

Bajo estas condiciones, se inyectaron de manera individual los estándares de los esteres metílicos de los ácidos grasos C₁₈ (oleico, linoléico y linolénico), para cada estándar se obtiene un pico cromatográfico con un perfil gaussiano y con tiempo de retención característico (ver cromatogramas 1-4 en el anexo 1).

Para corroborar la separación se realizó una mezcla estándar de estos derivados que consta de estándares de los tres ácidos grasos y el ácido mirístico que se utiliza como estándar interno (EI) y se inyecta al cromatógrafo 1 µL.

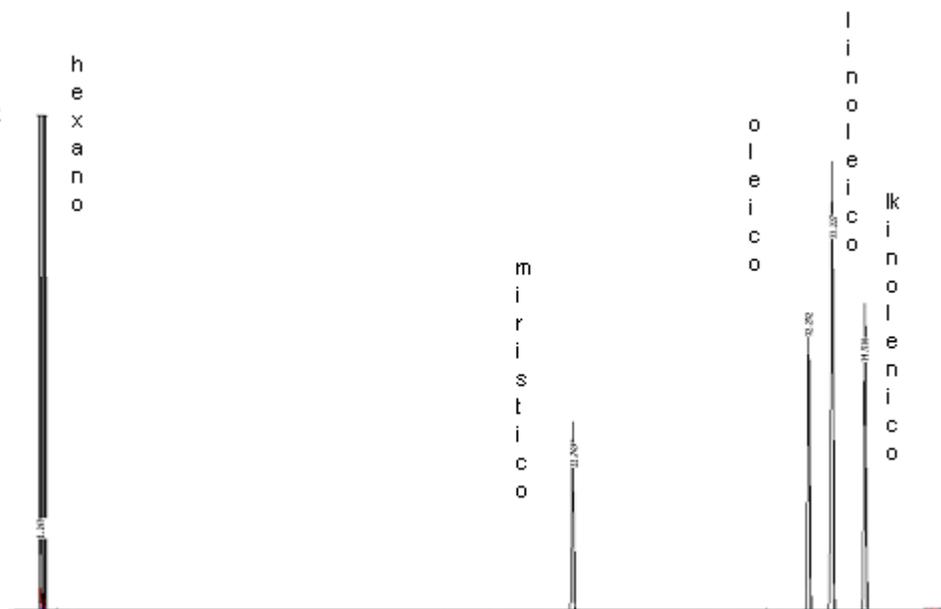


Figura 6. Orden de elusión: 1 n-hexano (solvente), 2 ácido mirístico (estándar interno), 3 ácido oleico, 4 ácido linoléico, 5 ácido linolénico

Condiciones de Operación: Instrumento: Varian 3800, Columna: Polietilenglicol DB-WAX, L=30m, DI=0.32mm, df=0.25µm, Programa de Temperatura: T1 :70°C ,1 min.; 4°C/min.; T2 :240°C, 15 min., Relación Split: 1 : 50, Flujo gas acarreador: Nitrógeno: 1.8 mL / min., Temperatura inyector: 250°C, Volumen inyección: 1 µL manual., Temperatura Detector: FID 250°C.

La Figura 6 exhibe el cromatograma que muestra la separación de esta mezcla que presenta cinco picos. El pico con T_R 1.41 es el n-hexano usado en la preparación de los sistemas; este pico se encuentra presente en todos los cromatogramas por lo tanto se ignora en discusiones posteriores.

Tabla 11. Tiempos de retención de los ácidos grasos C18

Ácido	t_R^* (min.)	% C. V.
Mirístico	22.75	0.01
Oleico	32.22	0.11
Linoléico	33.19	0.04
Linolénico	34.51	0.03

(*) promedio para 6 muestras

El orden de elusión para los ácidos grasos (Figura 6) es: mirístico, oleico, linoléico y linolénico. Las señales muestran para cada compuesto un comportamiento gaussiano bien definido y con una resolución aceptable entre compuestos adyacentes. La Tabla 11 presenta los tiempos de retención para cada ácido. El coeficiente de variación (CV) en cada caso es menor al 2% por lo que se cumple con el criterio de aceptación en cuanto a la reproducibilidad. Para verificar que la separación es buena, se calculó la R_s entre los picos adyacentes la cual se reporta en la Tabla 12.

Tabla 12. Valores de resolución de compuesto adyacentes

Par de ácidos	Resolución
Mirístico / oleico	66.96
Oleico / linoleico	7.49
Linoléico / linolénico	9.55

La Tabla 12 muestra las resoluciones de los compuestos adyacentes todos los casos se presenta que $R_s > 1.5$, por lo tanto se concluye que los compuestos están bien separados o resueltos en la columna y condiciones cromatográficas seleccionadas.

3.1 ELECCIÓN DEL ESTÁNDAR INTERNO

Como es conocido, en cromatografía de gases un factor importante en variación de resultados de cuantificación, es la reproducibilidad de la inyección la cual se minimiza utilizando un estándar interno. En el presente trabajo se utilizó el metil ester del ácido mirístico como estándar interno, debido a que éste posee características similares a los analitos (oleico, linoléico y linolénico) y no se encuentra presente en las muestras. Como se observa en la Figura 7 que corresponde a la derivatización de aceite mexicano, no existe ningún pico asociado entre los t_R 4-26 min., por lo tanto se puede utilizar al ácido mirístico (C_{14}) como estándar interno. Además, como el intervalo de tiempo donde no hay señales es amplio, se pueden proponer algunos otros ácidos saturados (C_8 - C_{14}) como reemplazo del estándar interno, siempre y cuando no exista interferencia con las muestras.

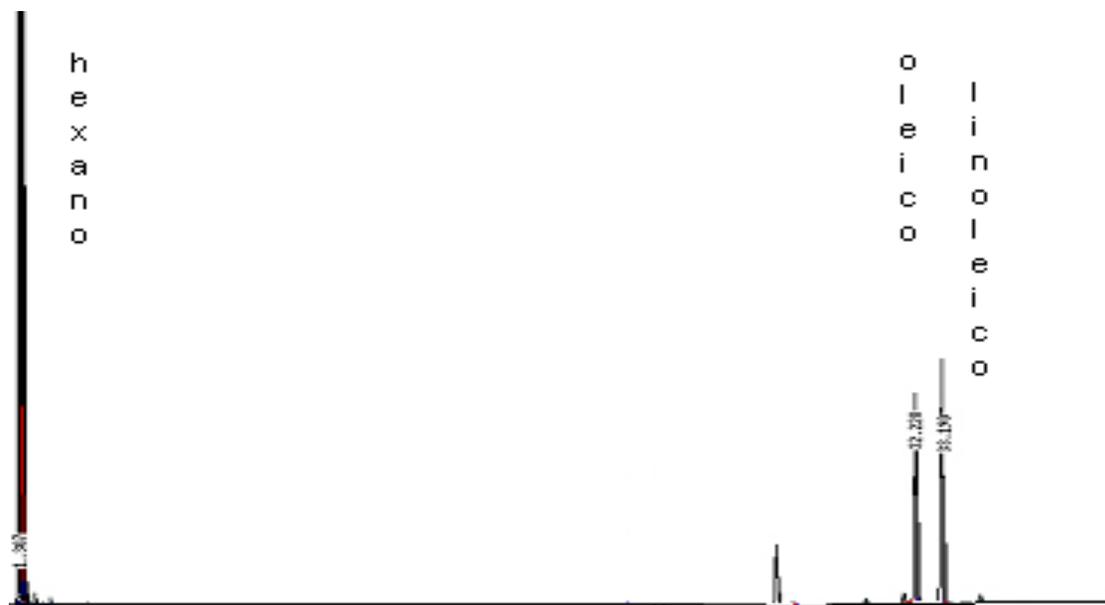


Figura 7. Cromatograma de la separación de los principales ácidos grasos en el aceite de oliva de origen mexicano: oleico, linoleico y linolénico

Condiciones de Operación: Instrumento: Varian 3800, Columna: Polietilenglicol DB-WAX, L=30m, DI=0.32mm, df=0.25µm, Programa de Temperatura: T1:70°C, 1 min.; 4°C/min.; T2:240°C, 15 min., Relación Split: 1 : 50, Flujo gas acarreador: Nitrógeno: 1.8 mL / min., Temperatura inyector: 250°C, Volumen inyección: 1 µL manual., Temperatura Detector: FID 250°C.

La Figura 7 muestra el cromatograma obtenido de la separación de los ácidos grasos C₁₈ en el aceite de oliva de origen mexicano. En donde se observa un pico cromatográfico correspondiente al ácido oleico y otro pico correspondiente al ácido linoleico, cada uno con un tiempo de retención característico.

3.2 ANÁLISIS DE LA LINEALIDAD.

Se diseñaron las curvas de calibración se acuerdo al procedimiento experimental descrito en la sección 2.5.4 En las curvas se utiliza el estándar interno a una concentración constante de 3.012 mg de ácido mirístico/mL. Las concentraciones reportadas para los ácidos en estudio se presentan en la siguiente Tabla.

Tabla 13. Concentración de los ácidos grasos para la curva de calibración

Sistema	[Oleico] mg/ml	[Linoleico] mg/ml	[Linolénico] mg/ml
1	1.048	1.128	1.08
2	2.096	2.256	2.16
3	3.144	3.348	3.24
5	5.240	5.640	5.40
6	6.280	6.768	6.48

De cada sistema se inyecta 1 μ L y se obtiene el cromatograma y reporte correspondiente, se verifica para cada uno la resolución entre los picos de interés. Las curvas de calibración se obtienen graficando la relación de áreas ($A_{\text{ácido}} / A_{\text{mirístico}}$) en función de la concentración del ácido de interés.

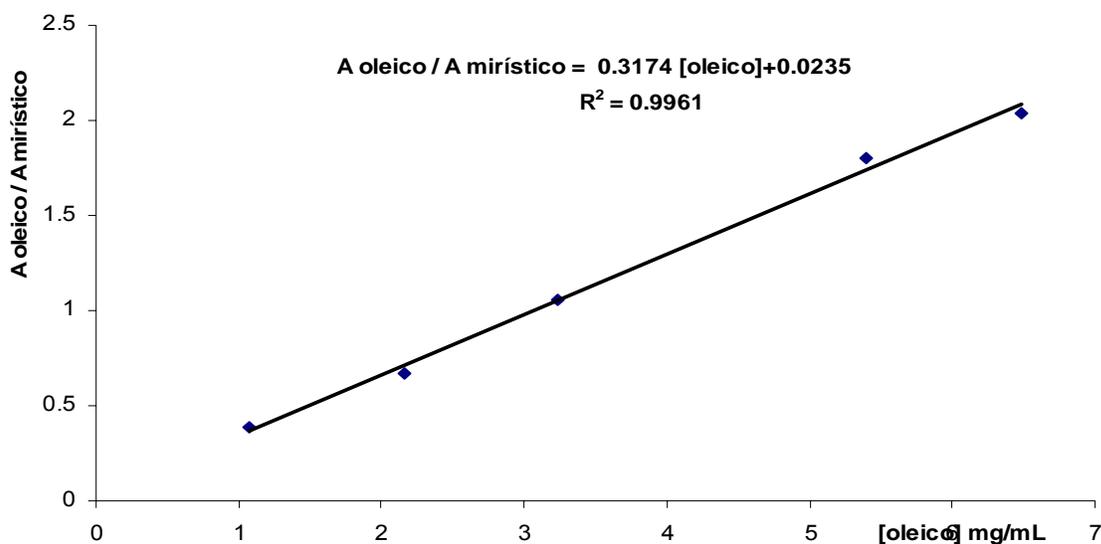


Figura 8 Curva de calibración para ácido oleico

La Figura 8 muestra la gráfica obtenida de estos parámetros para el caso del ester metílico del ácido oleico. En la gráfica se observa que existe una correlación acertada al aplicar el modelo lineal ($R^2 > 0.99$) con una ordenada al origen cercana a cero. El mismo comportamiento se observa con las graficas correspondientes a los ácidos linoleico y linolénico estas se presentan en las Figuras 9 y 10.

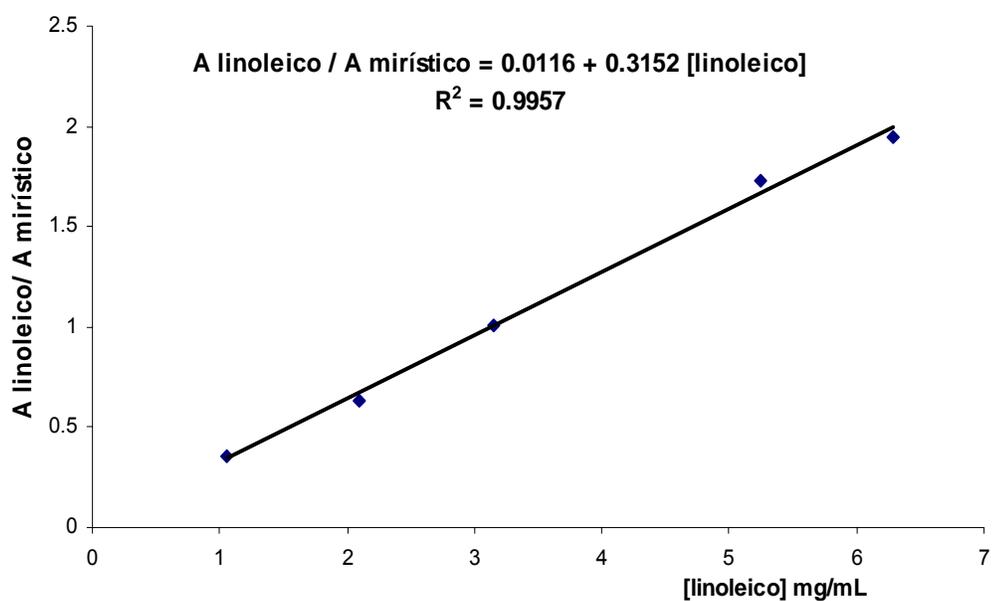


Figura 9 Curva de calibración del ácido linoléico

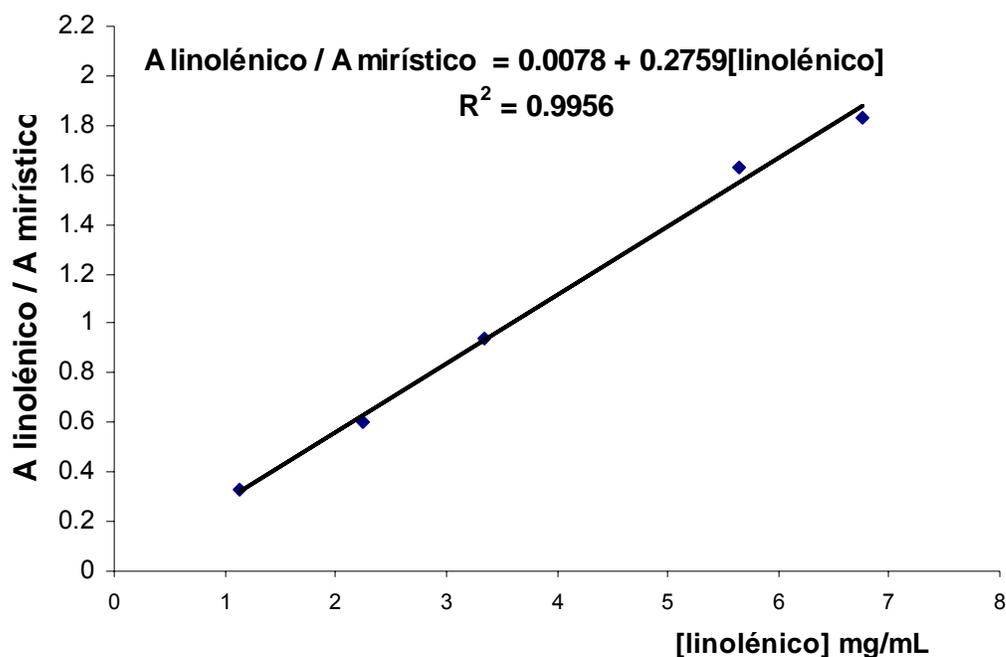


Figura 10 Curva de calibración del ácido linolénico

Dado que las curvas muestran un comportamiento lineal, la Tabla 14 resume los intervalos de concentración, las ecuaciones y los coeficientes de correlación para los diferentes ácidos de estudio.

Tabla 14. Ecuaciones y parámetros de las curvas de calibración de los ácidos

Ácido	Intervalo concentración (mg/mL)	Y = A _{ácido} / A _{mirístico} = m[ácido] + b	R ²
Oleico	1.08-6.48	Y = 0.3174 [oleico] + 0.0235	0.9961
Linoleico	1.05-6.29	Y = 0.3152 [linoleico] + 0.0116	0.9957
Linolénico	1.13-6.77	Y = 0.2759 [linolénico] + 0.0078	0.9956

Los valores de los factores de respuesta correspondientes fueron calculados de acuerdo con la ecuación:

$$\frac{\text{Área ácido}}{\text{Area E.I.}} = F \frac{\text{Conc ácido}}{\text{Conc. E.I.}}$$

Tabla 15. Valores del factor respuesta de los ácidos con respecto al mirístico

Ácido Graso	Factor respuesta
Oleico	0.9522
Linoleico	0.9456
Linolénico	0.8277

Los datos de la Tabla 15 reportan el factor de respuesta con respecto al metil ester del ácido mirístico, e indican como responde el detector cuando se tienen concentraciones iguales de estándar y estándar interno. En nuestro caso se observa que la respuesta disminuye conforme aumenta el número de insaturaciones.

3.3 Cuantificación de las muestras

Una vez obtenidas las curvas de calibración se utilizan en la cuantificación de tres diferentes marcas comerciales: Hojiblanca (Español), Carapelli Firenze (Italiano) y Oleoleico (Mexicano).

La cuantificación se hace por interpolación en la curva correspondiente según el ácido que se desea y se calcula en por ciento en peso. Los resultados obtenidos para el ácido oleico y linoleico se reportan en la Tabla 16. En todos los casos no fue posible detectar la presencia del ácido linolénico y por lo tanto no se cuantifica.

Tabla 16. Porcentajes de ácidos grasos en aceites de oliva según su origen.

Italiano		Español		Mexicano	
% oleico	% linoléico	% oleico	% linoléico	% oleico	% linoléico
58.1	6.2	50.8	6.1	35.2	36.5
59.0	6.2	51.0	6.1	35.5	37.2
59.2	6.4	51.1	6.2	35.9	37.5
60.3	6.4	51.3	6.2	36.7	37.6
60.4	6.5	51.8	6.4	37.0	37.6
60.4	6.5	51.8	6.4	37.5	38.0
60.4	6.6	51.9	*	*	38.6

Ácido Linolénico N.D., * muestra no evaluada

En la Tabla anterior podemos observar que el aceite de origen italiano presenta el porcentaje más alto de ácido oleico, seguido por el español, y por último el aceite de origen mexicano. Para el ácido linoléico, el aceite de origen mexicano presenta el mayor porcentaje de este ácido, seguido por el italiano y por último el español.

3.4 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

El tratamiento estadístico de los datos obtenidos se llevó a cabo mediante el programa *Statgraphics plus 5.0*. Este tratamiento consistió, en primer lugar, en hacer un análisis de varianza sobre los datos de porcentaje de ácido oleico y linoléico para 3 diferentes niveles en relación a su origen, el cual tuvo como fin analizar la dispersión obtenida para cada nivel. En segundo lugar, se llevó a cabo un análisis de varianza de las medias de los 3 diferentes niveles para intentar compararlas, a fin de analizar si los porcentajes obtenidos, tienen una relación directa con su origen.

Análisis para ácido oleico

Variable dependiente: PORCENTAJE

Factor: ORIGEN

Selección de variable: OLEICO

Número de observaciones: 20

Número de niveles: 3 (español, italiano y mexicano)

Análisis de la dispersión de las medidas

El procedimiento realizado del análisis de la varianza en un sentido, muestra que la dispersión de los datos del ácido oleico y del linoléico (Figuras 11 y 12) es estadísticamente aceptable.

Asimismo, de la Tabla 17 se observa que la desviación estándar más pequeña fue para las muestras del aceite español, mientras que para el mexicano e italiano son aproximadamente del mismo orden de magnitud. Este comportamiento está íntimamente relacionado, principalmente, con la técnica de derivatización y la repetibilidad de la inyección.

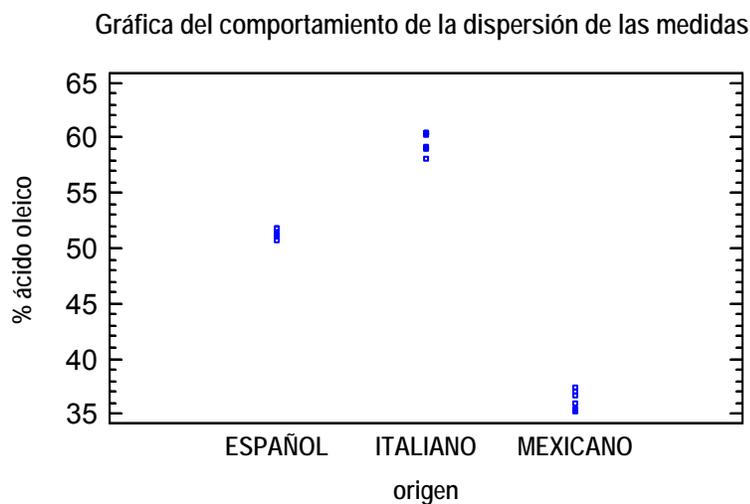


Figura 11. Gráfica del comportamiento de la dispersión de las medidas para el ácido oleico.

Tabla 17. Resumen estadístico para el porcentaje del ácido oleico

ORIGEN	número	promedio	desviación estándar	cv
ESPAÑOL	7	51.3714	0.445512	0.86
ITALIANO	7	59.6971	0.93055	1.55
MEXICANO	6	36.2967	0.885882	2.44
Total	20	49.763	9.75296	

Resumen del Análisis

Variable dependiente: PORCENTAJE

Factor: ORIGEN

Selección de variable: LINOLEICO

Número de observaciones: 20

Número de niveles: 3 (español, italiano y mexicano)

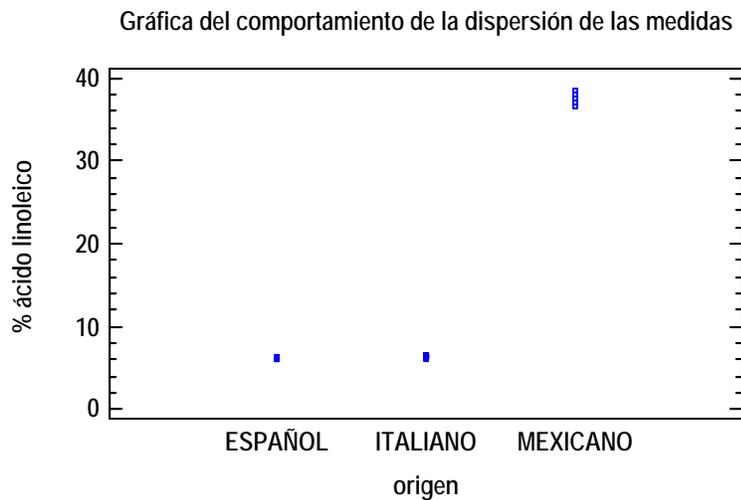


Figura 12. Gráfica del comportamiento de la dispersión de las medidas para el ácido linoléico.

Tabla 18. Resumen estadístico para el porcentaje del ácido linoléico

ORIGEN	número	promedio	desviación estándar	cv
ESPAÑOL	6	6.25	0.138996	2.22
ITALIANO	7	6.39286	0.134501	2.10
MEXICANO	7	37.5586	0.646334	1.72
Total	20	17.258	15.288	

Análisis del comportamiento de la dispersión de las medidas del ácido oleico

Se puede constatar que los intervalos asociados a cada medida (Figura 13), no se traslapan, por lo que se puede afirmar que cada medida proviene de un ácido de diferente origen. También podemos decir que de los tres aceites, el italiano posee una mejor calidad por presentar un mayor contenido de ácido oleico, siguiéndolo el español y por último el mexicano. Además, este último no cubre las expectativas del contenido que un aceite de oliva extra virgen debe presentar, ya que el intervalo característico de un aceite de este tipo es del 55-83%.[21] En otras palabras, podemos afirmar que el aceite mexicano dista mucho de ser un aceite de oliva de la categoría extra virgen, cuya composición se encuentra dentro de los siguientes parámetros: 55-83% de ácido oleico, 3.5-21% ácido linoléico y <0.9% de ácido linolénico.[21] Este hecho podría deberse a una posible adulteración o bien a que las aceitunas de origen mexicano no presenten los mismos contenidos que las europeas.

Intervalos de diferencias mínimas significativas (LSD) de las medias al 95 %

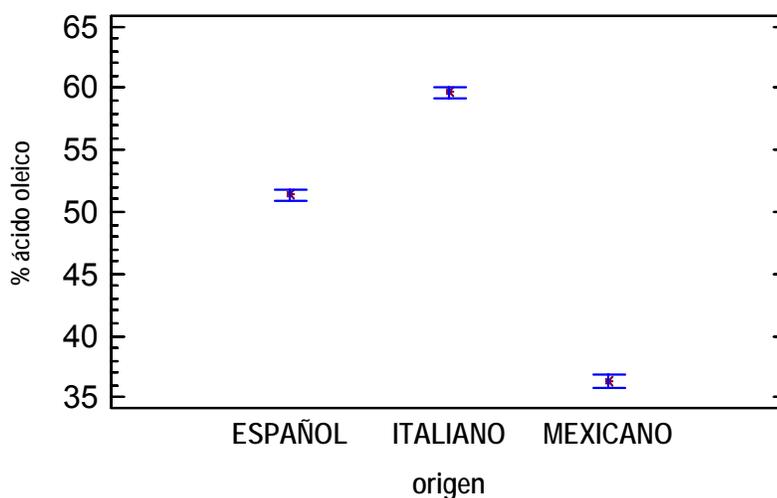


Figura 13. Intervalos de las diferencias mínimas significativas (LSD) de las medias al 95%, para el ácido oleico.

Por otra parte, de la Tabla 19 se observa que el nivel de significancia del valor de p (p-value) es 0.0000 (menor de 0.05), lo que indica que las medias de los porcentajes son diferentes, es decir, que los porcentajes tienen orígenes diferentes.

Tabla 19. Tabla de ANOVA para PORCENTAJE por ORIGEN para el ácido oleico

Fuente	Suma cuadrados	Df	Media de cuadrados	F	Valor de P
Entre grupos	1796.97	2	898.486	1481.45	0.0000
Dentro grupos	10.3104	17	0.606492		
Total (Corr.)	1807.28	19			

Tabla 20. Medias para PORCENTAJE por ORIGEN con 95% de confianza (LSD) para el ácido oleico

Origen	Número	Media	Error estándar	Límite inferior	Límite superior
Español	7	51.3714	0.29435	50.9323	51.8106
Italiano	7	59.6971	0.29435	59.258	60.1363
Mexicano	6	36.2967	0.317934	35.8224	36.771
Total	20	49.763			

Análisis del comportamiento de la dispersión de las medias del ácido linoléico

Se puede constatar que los intervalos asociados a las medias de español e italiano (Figura 14) se traslapan, a diferencia del mexicano que no se traslapa. Este significa que el porcentaje de ácido linoléico no se puede considerar como un criterio para designar su origen en el caso de español o italiano. Sin embargo, para el mexicano se puede afirmar que éste es de diferente origen con respecto al español e italiano.

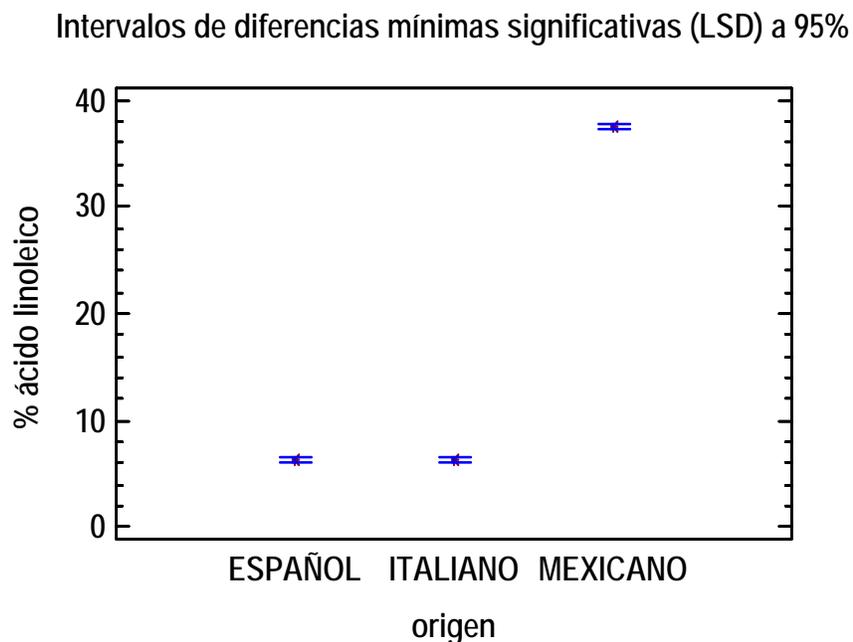


Figura 14. Intervalo de diferencias mínimas significativas (LSD) al 95% para ácido linoléico.

En un aceite de oliva extra virgen el contenido de ácido linoléico es típicamente menor al 21%. [10]

La Figura 14 muestra que el tanto el aceite español como el italiano cumplen con esta especificación, a diferencia del mexicano que se encuentra muy por arriba de este valor. De acuerdo a la literatura un valor de linoléico mayor al 21% indica la presencia de aceite de cacahuate, algodón, girasol, maíz, soya y ajonjolí. [21]

En resumen, considerando ambos contenidos se puede concluir que los aceites español e italiano se encuentran dentro de la categoría de aceites de oliva extra virgen, mientras que el mexicano dista mucho de serlo.

A partir de este estudio nos proponemos ampliar este análisis a un mayor número de muestras de diversos orígenes y marcas a fin de verificar si estos criterios se siguen cumpliendo.

CONCLUSIONES:

- ✓ Se establecieron las condiciones cromatográficas para la separación de los principales ácidos grasos presentes en el aceite de oliva.
- ✓ Se optimizaron las condiciones de reacción para llevar a cabo la derivatización de los ácidos grasos contenidos en el aceite de oliva.
- ✓ Se identificaron y determinaron los ácidos grasos presentes en los diferentes tipos de aceites de oliva mediante el uso de curvas de calibración que involucraron al ácido mirístico como estándar interno.
- ✓ El aceite de oliva con mayor porcentaje de ácido oleico fue el italiano, el siguiente fue el español, cubriendo ambos el perfil de calidad de aceite de oliva extra virgen. El aceite mexicano se encontró con un porcentaje muy por debajo de los anteriores, fuera de los valores de calidad establecidos para la denominación indicada en el marbete.
- ✓ Mediante el programa "*statgraphics Plus 5.0*" se establece la existencia de una relación importante entre la composición de los diferentes ácidos grasos con el origen del aceite.
- ✓ El presente trabajo permitió desarrollar la metodología para la identificación y determinación de los principales ácidos grasos presentes en el aceite de oliva, misma que se utilizó en la práctica diseñada para la enseñanza instrumental de los laboratorios de Química Analítica. (anexo 3, Pág. 60)

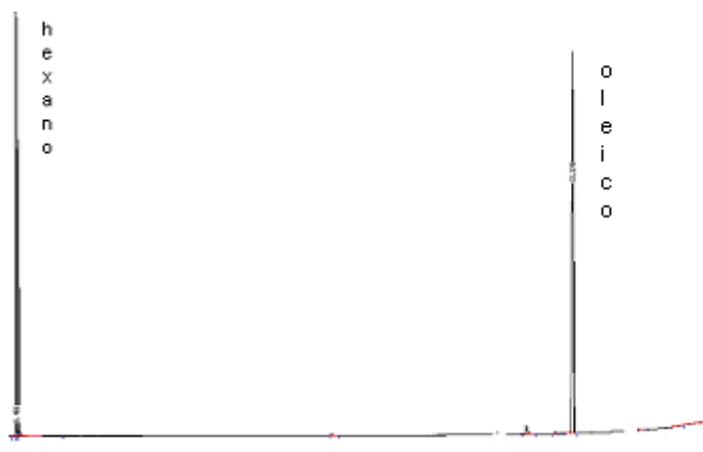
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- [1] Kiritsakis A. K., American Oil Chemists' Society, (1991).
- [2]. Guimet Francesca, Ferre Joan, Boque Ricard Ann. Chim. Acta 544 (2005) 143-152.
- [3]. Shaw Adrian D., Angela di Camillo, Giovanna Vlahov, Alun Jones, Giorgio Bianchi, Jem Rowland, Douglas B. Kell , Ann. Chim Acta 348 (1997) 357-374.
- [4] Aldridge W.N., Toxicology Lett, 64-65 (1992) 59-70.
- [5] Anon. in L'Informatore Agrario, vol 18, (1994), pp.41.
- [6] Lercker G., M.T. Rodríguez-Estrada, J. Chromatography A, 881 (2000) 105-129.
- [7] El-Hamdy H. Ali, Naima K. El-Fizga, J. Chromatography A, 708 (1995) 351-355.
- [8] Knapp Daniel R., Handbook of Analytical Derivatization Reactions, "A Wiley-Interscience Publication", U.S.A.,(1979), p.p. 2-23, 146-241.
- [9] Aparicio Ramón, Ramon Aparicio Ruíz; Journal of Chromatography A. 881 (2000) 93-104.
- [10] Hamilton R. J., J. B. Rosell *Análisis of oils and fats*. p.p. 679-901 Elsevier Applied Science London, New York.
- [11] Harris C. Daniel, *Quantitative Chemical Analysis* W.H. Freeman and Company. U.S.A. (2003). p.p. 578-605.
- [12] Jurado, B. J. L. *Colección de Química Analítica, Cromatografía en fase gaseosa*, FES-Cuautitlán, México (1991) p.p. 1-4, 10-44, 59-78.
- [13] Douglas A, Skoog, Donald M. West, F. James Holler, Stanley R. Crouch. *Fundamentos de Química Analítica*, Ed. Thomson 8ª. Ed., España (2005).
- [14] Rouessac, F. A. *Chemical Analysis Modern Instrumentation, Methods and Technics*, 4th Ed, John Wiley and sons. p.p. 3-20, 23-32.
- [15] Baugh, P.S. *Gas Chromatography, A Practical Approach*, The Practical Series, Oxford University Press, Oxford, (1993). p.p. 1-6, 15-38.
- [16] *Producción, Análisis y Control de calidad de Aceites y Grasas Comestibles*. AMV Ediciones Madrid, (1988).
- [17] Criddle, Ellis, *Spectral and Chemical Characterization of Organic Compounds*, Ed. John Wiley and Sons, (1980).
- [18] *Métodos de Análisis FAO/OMS del Codex Alimentarius para grasas y aceites comestibles*, ONU para la agricultura y la alimentación. Italia (1970).
- [19] *Producción, Análisis y Control de calidad de aceites y grasas comestibles*. Editorial Madrid Vicente Ediciones Madrid, España.

- [20] Michael Joe, *Oils and fats Authentication*, head of Lipids Section. Reading Scientific services LTD. Reading UK, Blackwell Publishing CRC Press. p.p. 25-65.
- [21] *Aceites y grasas Comestibles-Análisis- Normas Comisión mixta* FAO / OMS
- [22] *Métodos de Análisis FAO/OMS del Codex Alimentarius para grasas y aceites comestibles*, ONU para la agricultura y la alimentación, Italia, (1970).

ANEXO 1

Condiciones de Operación: Instrumento: Varian 3800, Columna: Polietilenglicol DB-WAX, L=30m, DI=0.32mm, df=0.25µm, Programa de Temperatura: Ti :70°C ,1 min.; 4°C/min. ; T2 :240°C, 15 min, Relación Split: 1 : 50, Flujo gas acarreador: Nitrógeno: 1.8 mL / min., Temperatura inyector: 250°C, Volumen inyección: 1 µL manual., Temperatura Detector: FID 250°C.



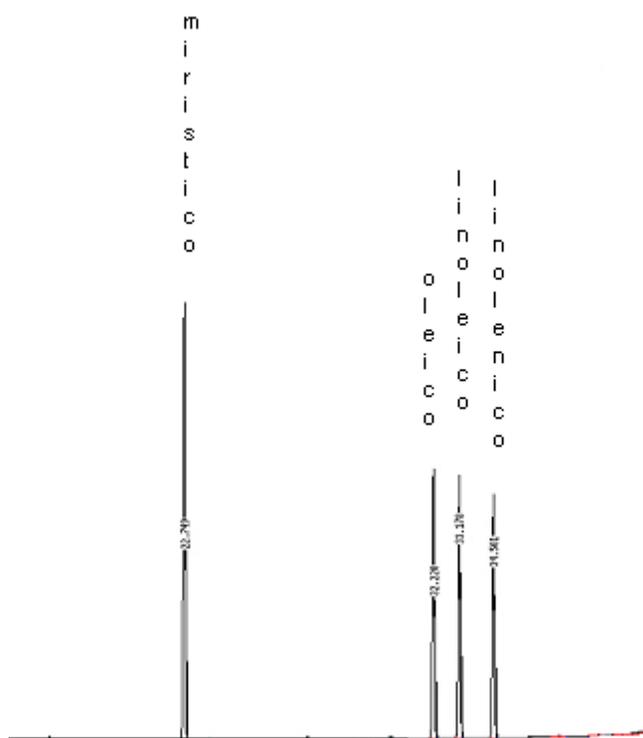
Cromatograma 1: estándar del ester metílico de ácido oleico



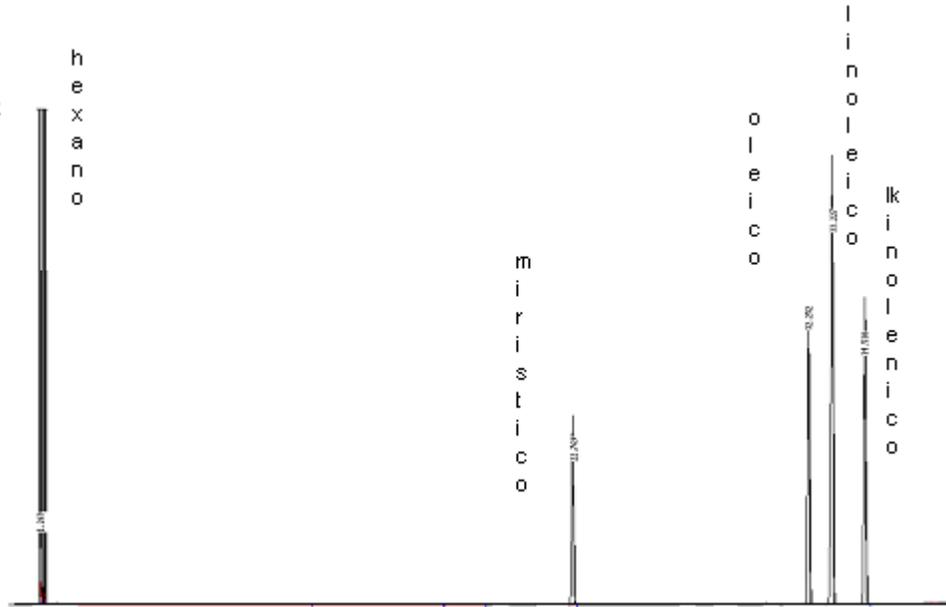
Cromatograma 2: Estándar del ester metílico de ácido linoléico



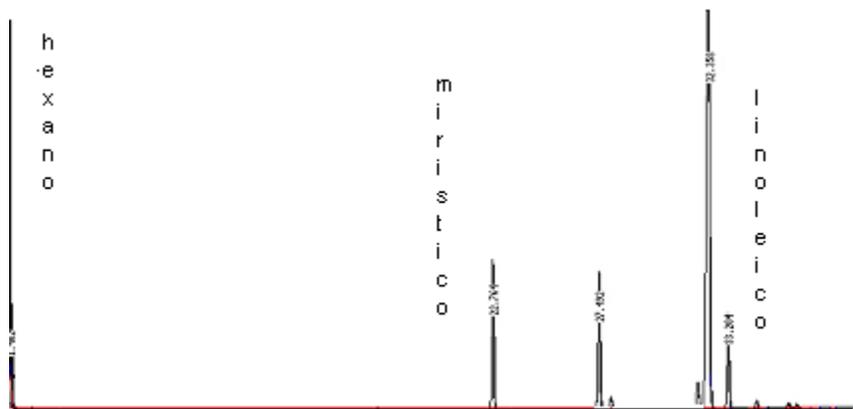
Cromatograma 3: Estándar del ester metílico de ácido linoléico



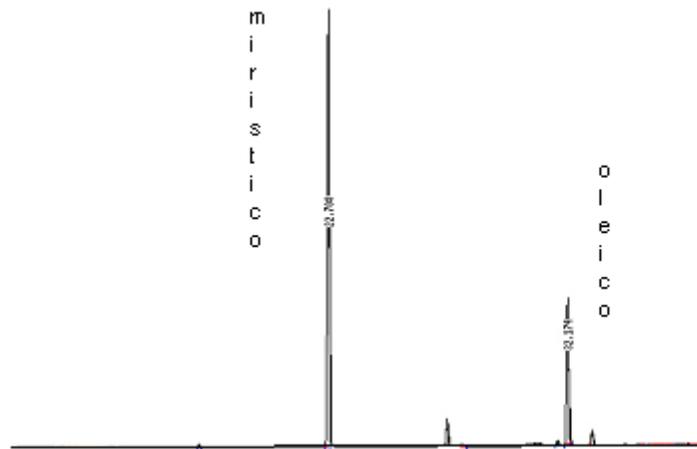
Cromatograma 4: Estándares de esteres metílicos de ácido oleico, linoléico y linolénico y estándar interno (mirístico)



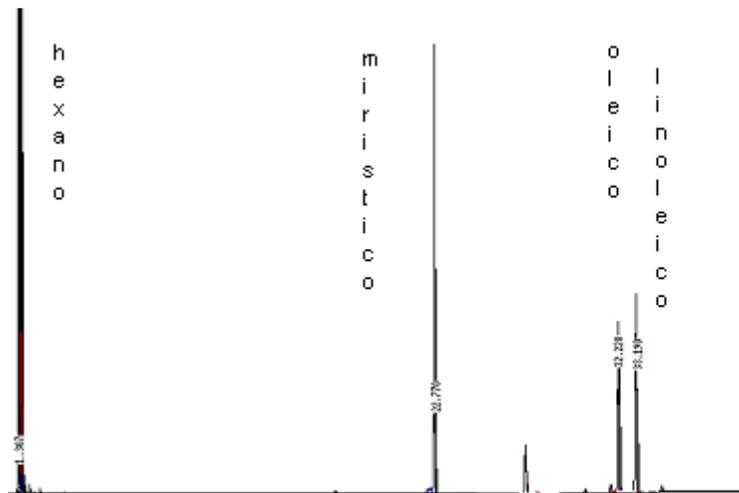
Cromatograma 5: Mezcla de estándares de ésteres metílicos de ácidos grasos y solvente (n-hexano)



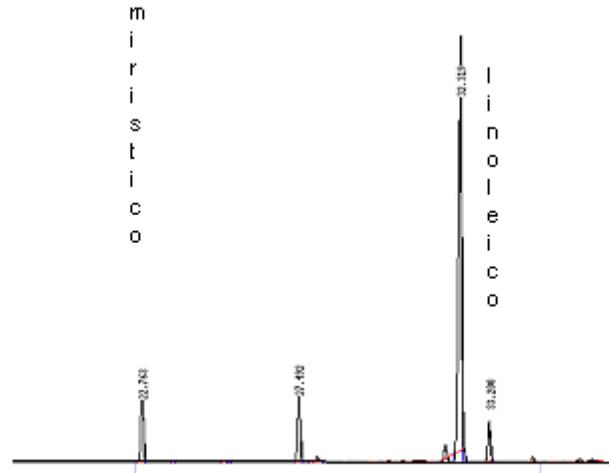
Cromatograma 6: Aceite Italiano -linoléico



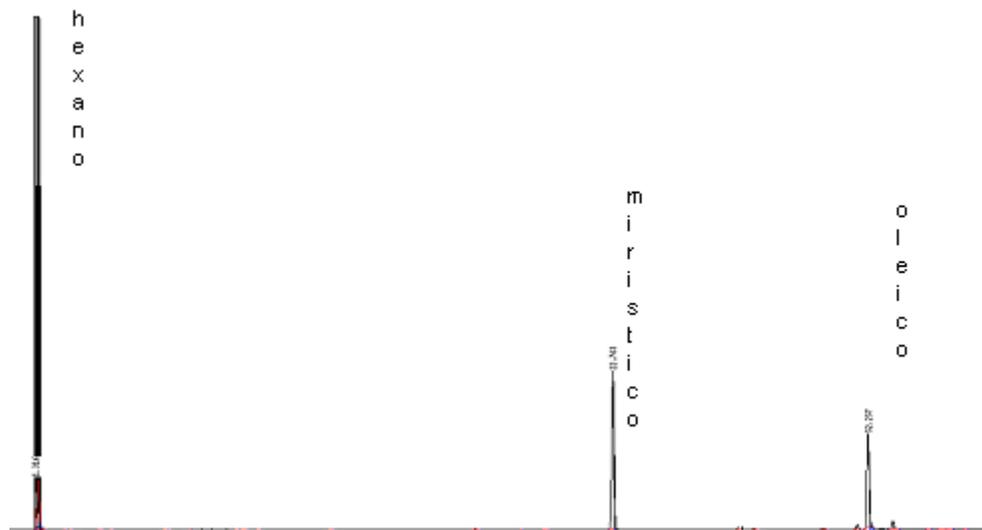
Cromatograma 7: Aceite Italiano -oleico



Cromatograma 8: Aceite Mexicano- oleico- linoléico



Cromatograma 9: Aceite Español- linoléico



Cromatograma 10: Aceite Español- oleico

ANEXO 2

Etiquetas de las marcas comerciales de los aceites utilizados



Figura 15: Frente de la etiqueta del aceite de origen mexicano



Figura 16: Etiqueta posterior del aceite de origen mexicano



Figura 17: Etiqueta posterior del aceite de origen italiano



Figura 18: Frente de la etiqueta del aceite de origen italiano



Figura 19: Etiqueta posterior del aceite de origen español



Figura 20: Frente de la etiqueta del aceite de origen español

ANEXO 3

Práctica diseñada

IDENTIFICACIÓN Y DETERMINACION DE ACIDOS GRASOS EN ACEITES DE OLIVA POR CROMATOGRAFIA DE GASES CAPILAR

I. OBJETIVO

Identificar y determinar los ácidos grasos presentes en un aceite de oliva por cromatografía de gases capilar, previa derivatización, con el fin de detectar la calidad y/o adulteración en los mismos.

II. CUESTIONARIO PREVIO

1. Mencionar brevemente los componentes y su función de un cromatógrafo de gases.
2. Explicar brevemente el fundamento del detector de flama (FID).
3. ¿En qué consiste la cromatografía de gases capilar?
4. ¿Cómo se define un factor de respuesta y cuál es su utilidad?
5. ¿Con que fin se lleva a cabo la derivatización de los analitos en un análisis cromatográfico?
6. ¿Cuáles son principales ácidos grasos presentes en el aceite de oliva y cuál es su estructura química?

III. PARTE EXPERIMENTAL

1. Soluciones:

- a) Hidróxido de potasio al 5% (p/v) en metanol.
- b) Ácido clorhídrico al 10% (v/v) en metanol.
- c) Bicarbonato de sodio al 5% (p/v) en agua.
- d) Estándares de los esteres metílicos de los ácidos oleico, linoléico y linolénico 25 mg/mL cada uno, en n-hexano.
- e) Mezcla de estándares de esteres metílicos de los ácidos oleico, linoléico y linolénico 25 mg/mL cada uno, en n-hexano.
- f) Solución de estándar interno (éster metílico del ácido mirístico de 15 mg/mL, en n-hexano.

2. Determinación de los tiempos de retención (t_R) de esteres metílicos de los ácidos oleico, linoléico y linolénico 25 mg/mL:

Se inyecta 1 μ L de cada ester metílico de ácido graso, bajo las condiciones de operación según la Tabla 2. Anotar los resultados en la Tabla 1.

Tabla 1. Tiempos de retención de los metil esteres

Ester metílico	Tiempo de retención (min.)
Oleico	
Linoléico	
Linolénico	
Mirístico	

3. Obtención de la curva de calibración:

La preparación de los sistemas para la obtención de la curva de calibración, se realizan según la Tabla 2:

Tabla 2. Preparación de los sistemas para curva de calibración

Sistema	Mezcla de estándares (25 mg/mL) (mL)	Estándar interno (15 mg/mL) (mL)	Aforo con hexano (mL)
1	0.2	1	5
2	0.4	1	5
3	0.6	1	5
4	0.8	1	5
5	1.0	1	5
6	1.2	1	5

Cada sistema, después de prepararlo, se guarda en viales, se sellan con cinta teflón y tapan. Si no se inyectan inmediatamente, se mantiene refrigerados hasta el momento de ser inyectados en el cromatógrafo de gases. Se inyecta 1 µL de cada sistema en el cromatógrafo de gases, bajo las condiciones de operación según la Tabla 3.

4. Obtención de derivados de metil ester del aceite de oliva:

- 1) En un vial se pesan aproximadamente 40 mg si se va a determinar el oleico y 125 mg si se va a determinar el ácido linoléico o el linolénico.
- 2) Se agrega 1 mL de KOH al 5% en metanol. Se tapa con teflón y se mete a la estufa durante 1 h a 80°C.
- 3) Se deja enfriar y se agregan 2 mL de HCl al 10% en metanol
- 4) El vial se tapa con teflón y se calienta en la estufa durante 1 h a 80°C.
- 5) Se deja enfriar y se agregan 2ml de agua. Se neutraliza agregando poco a poco 1ml de bicarbonato de sodio al 5%, agitando suavemente para evitar que se derrame. Se agregan 2 ml de n-hexano, se agita las dos fases con un vortex de 5 a 10 min.. y se deja reposar.
- 6) Se separa la fase de hexano, utilizando una pipeta pasteur. Se coloca la fase orgánica en un matraz aforado de 5 ml al que previamente se le ha adicionado 1 ml de solución de estándar interno.
- 7) Se afora con n-hexano y se transvasa a un vial. En caso de que esta fase presente turbidez, se agregan unos granitos de sulfato de sodio anhidro para eliminar el agua. Los viales se sellan con teflón y se mantienen en refrigeración, hasta que se inyecten. Se inyecta 1 µL en el cromatógrafo de gases, bajo las condiciones de operación según la Tabla 3.

Tabla 3. Condiciones de operación del cromatógrafo de gases

Parámetro	Especificación
Cromatógrafo gases	Back Scientific modelo 910
Columna	Megabore DB-5MS, longitud 60m, DI=0.53, df=1.5 µm
Programa Temperatura	Ti 70°C, 5 min., 4°C/min., Tf 240°C, 15 min.
Flujo gas acarreador	Nitrógeno: mL / min.
Volumen inyección	1 µL manual.
Temperatura detector	FID 250°C

IV. INFORME DE TRABAJO

Puntos mínimos

- 1) Discutir cuál es la ventaja de usar un programa de temperatura y no un modo isotérmico.
- 2) Discutir la naturaleza de la columna usada.
- 3) Identificar cada uno de los ácidos grasos de la muestra de aceite de oliva, de acuerdo a los tiempos de retención de la Tabla 1.
- 4) Trazar la curva de calibración Área metil ester / Área estándar interno vs. [metil ester] / [estándar interno] y determinar el factor de respuesta.
- 5) Cuantificar el por ciento de cada ácido graso contenido en el aceite de oliva. Comparar con los contenidos típicos reportados en la literatura y concluir.

V.-BIBLIOGRAFÍA SUGERIDA

- 1) Harris, D. Análisis Químico Cuantitativo. Iberoamericana. México. (1992).
- 2) Skoog Douglas, West Donald y Holler James. Química Analítica. 6a. Ed. McGraw-Hill. México. (1995).