UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

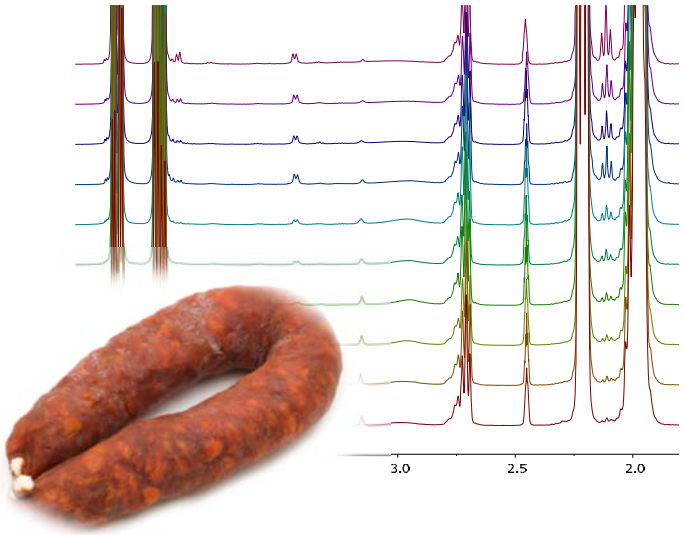
TESIS DOCTORAL

Título
Aplicación de la espectroscopia de resonancia magnética nuclear al análisis de embutidos
Autor/es
Emilio San Martín García
Director/es
Jesús Manuel Peregrina García y Jesús Héctor Busto Sancirián
Facultad
Facultad de Ciencia y Tecnología
Titulación
Departamento
Química
Curso Académico

Aplicación de la espectroscopia de resonancia magnética nuclear al análisis de embutidos, tesis doctoral de Emilio San Martín García, dirigida por Jesús Manuel Peregrina García y Jesús Héctor Busto Sancirián (publicada por la Universidad de La Rioja), se difunde bajo una Licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Unported.
Permisos que vayan más allá de lo cubierto por esta licencia pueden solicitarse a los titulares del copyright.

© El autor
© Universidad de La Rioja, Servicio de Publicaciones, 2020
publicaciones.unirioja.es
E-mail: publicaciones@unirioja.es

APLICACIÓN DE LA ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR AL ANÁLISIS DE EMBUTIDOS



Emilio San Martín García

Universidad de La Rioja

2019

FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
ÁREA DE QUÍMICA ORGÁNICA

TESIS DOCTORAL

APLICACIÓN DE LA ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR AL ANÁLISIS DE EMBUTIDOS

Memoria presentada en la Universidad de La Rioja
para optar al grado de Doctor en Química por

Emilio San Martín García

Septiembre 2019

JESÚS MANUEL PEREGRINA GARCÍA, Catedrático de Química Orgánica del Departamento de Química de la Universidad de la Rioja y

JESÚS HÉCTOR BUSTO SANCIRIÁN, Profesor Titular del Departamento de Química de la Universidad de la Rioja

CERTIFICAN:

Que la memoria ***"Aplicación de la resonancia magnética nuclear al análisis de embutidos"*** *ha sido realizada por el Licenciado* ***Emilio San Martín García*** *en el Departamento de Química de la Universidad de La Rioja bajo su inmediata dirección y reúne las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor en Química.*

Logroño, septiembre 2019

Los directores,

Jesús M. Peregrina García	J. Héctor Busto Sancirián

"Quien deja de aprender se hace viejo, tanto a los 20 como a los 80. Quien sigue aprendiendo permanece joven. Y eso es lo más importante en la vida, mantener una mente joven"

Henry Ford

AGRADECIMIENTOS

Como si de una buena película se tratase, esta tesis es el final feliz de una historia que comenzó en fracaso. Todo empezó cuando el que había sido mi jefe durante 13 años decidió que yo ya no era el más indicado para seguir desempeñando mi trabajo. Al paro. El caso es que así, de sopetón, después de tanto tiempo tocaba rehacer mi vida y, como se dice ahora, reinventarme. Muchos buenos amigos me apoyaron y me convencieron de que era una oportunidad única para completar algunas cosas pendientes, como sacarme el B2 de inglés, el Máster de Profesorado o… la tesis doctoral. Ya sabréis que aquella primera tesis en la que trabajé no acabó de cuajar; una línea de investigación nueva, pocos resultados… Y, por si fuera poco, el trabajo y la familia se cruzaron por el camino. La vida es una carrera de fondo en la que debes elegir entre esprintar a por todas, con riesgo de lesionarte, o abandonar. Abandoné la tesis cuando sólo me faltaba escribirla. Aposté mi tiempo a aquel empleo y a formar una bonita familia. No me arrepiento. Bueno, de lo del trabajo sí me arrepiento, sobre todo por cómo me lo agradecieron.

El caso es que, con más de cuarenta años, dos hijos y todas las barbas, me examiné del B2, me matriculé en el Máster y llamé a la puerta de mi antiguo grupo de investigación. Hablé con Pere sobre empezar una tesis. Yo tenía experiencia en tecnología de alimentos, así que la temática sería análisis de alimentos con RMN.

Pensándolo fríamente, lo cierto es que Pere no tenía ninguna necesidad de embarcarse en una nueva dirección de tesis, en una temática que no era la línea principal de investigación del grupo y con un doctorando que podría dejarle plantado por otro trabajo en cualquier momento. Y, sin embargo… aceptó. Habría tesis, y mis directores serían Héctor y Pere. Y no puedo estar más agradecido. Muchas gracias por acogerme de vuelta en este grupo, por aceptarme de nuevo, pasados tantos años, como si nunca me hubiese ido. Me siento muy orgulloso de formar parte de esta pequeña familia.

Dicen que el doctorado es una etapa dura, desquiciante, llena de estrés y sinsabores. Pero si tienes la suerte de estar rodeado de tan buenos compañeros es mucho más llevadero. Sois muchos los "culpables" de que estos años, lejos de ser desquiciantes, hayan sido maravillosos.

Pere, muchas gracias por decir sí a todo. Por contagiar ese optimismo y buen humor y por regalarme tanto tiempo de forma desinteresada. Eres el mejor resucitando el RMN. Héctor, has sabido ser buen director y gran compañero a la vez. Me has ayudado mucho con los programas de pulsos y siempre has venido corriendo a solucionar los problemas. Alberto, aunque no te tocaba estar involucrado en este trabajo siempre has ayudado con tu visión y tu experiencia, siempre incitando a pensar más allá. Marimar, siempre de buen humor, has sido una gran ayuda en la gestión de compras. Paco, antiguo compañero de fatigas en el laboratorio. Eres un trabajador inagotable y contagias energía.

Respecto a la gente joven del laboratorio, mucho tengo que agradecer a todos vosotros, colegas, compañeros y amigos, que desde el primer día habéis conseguido que este viejales cascarrabias y raruno se sienta parte del equipo. La diferencia de edad puede separar mucho, pero lo cierto es que ha resultado muy fácil conectar. Y es que siempre es más fácil cuando hay buena gente. Me habéis acogido como a uno más y me habéis tendido una alfombra roja. Incluso para la juerga. Una pena no haberos podido seguir el ritmo… aunque reconozco que he rejuvenecido bastante a vuestro lado.

Todo mi cariño para los compas de despacho, que me habéis contagiado de la energía indómita de Ismael, el buen corazón y la nobleza de Pablo, la simpatía infatigable de Xhenti, el humor espontáneo de Paula, la mesura astuta de Alicia o la afable locuacidad de Ester.

No puedo olvidarme de mis compañeros "egresados", y de los buenos momentos que vivimos juntos, con Marta y su imaginación desbocada, Claudio con su sensatez y templanza, Iris tan combativa y Nuria con su repostería.

También pude compartir grupo brevemente con Guille y su particular humor; y con otras viejas glorias como Charly, Víctor, Iván y David.

Y aunque he compartido la mayor parte del tiempo con mis colegas de grupo, también me ha tocado convivir con el resto de la gran familia que es este Departamento. Un

abrazo grande para los amigos “fotos”, Pedro, Miguel Ángel, Diego, Raúl, David, Edu y Elena, y otro gran abrazo para los colegas “inorgánicos”.

Fuera de la Universidad, tengo que agradecer también todo el apoyo que me han prestado mis seres queridos. A mi querida Mayte, esposa, compañera, amante, socia, cómplice y aliada; que tanto apoyo, soporte y consuelo me ha prestado. A mis queridos hijos, Celia y Mario, por su amor y su comprensión. Y al resto de mi familia, que siempre están ahí cuando hace falta.

Este trabajo ha sido posible gracias al apoyo económico de ADER a través del proyecto ADER 2014-I-IDD-00142 “Espectroscopia RMN como herramienta de control de calidad y mejora en embutido curado”

Por supuesto, gracias a toda la ayuda de Raquel Sanz desde la OTRI y gracias a la inestimable colaboración de Delia Gil y la empresa Embutidos Luis Gil por haber hecho posible el proyecto.

RESUMEN

Esta tesis doctoral se centra en la aplicación de la resonancia magnética nuclear (RMN) de medio campo (400 MHz) al análisis de la fracción grasa de embutidos como el chorizo. La espectroscopia de RMN ha demostrado ventajas en al análisis de grasas como el aceite, aunque para exprimir todo su potencial suelen ser necesarios equipos de RMN de alto campo o estrategias de derivatización.

Nuestro trabajo consistió en la optimización de la metodología de análisis con RMN hasta hacerla factible como análisis de rutina de grasas. El ajuste de algunos parámetros experimentales como el número de *scans*, la demora de relajación o el desacoplamiento de banda ancha de heteroátomos permitió solventar algunas dificultades relacionadas con la sensibilidad y el solapamiento de señales. Adicionalmente, el uso de mezclas de disolventes que incorporan dimetilsulfóxido hexadeuterado aportó una mejora considerable en la resolución.

La nueva metodología de análisis permite la detección y cuantificación de diglicéridos, monoglicéridos, ácidos grasos libres y otros componentes minoritarios a través de un único y corto experimento, a la vez que caracteriza los constituyentes mayoritarios de la grasa. Fue analizada la evolución de la grasa del chorizo a lo largo de todo el ciclo de maduración-secado y posterior conservación en condiciones reales de producción. También fue comparada la evolución de la grasa en diferentes lotes de chorizo, incluyendo el efecto de cambios composicionales menores (reducción de sal, adición de antioxidantes) y el efecto de cambios composicionales mayores (carnes de partida de diferentes orígenes). Pudo comprobarse que la naturaleza de la carne afecta más al avance de la lipólisis que los cambios en ingredientes.

En conclusión, la metodología de análisis por RMN optimizada es simple y directa y puede ser aplicada con facilidad al estudio y seguimiento de la evolución de los embutidos durante todo el proceso de elaboración.

ABSTRACT

The present doctoral thesis focuses on the application of medium field (400 MHz) nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy to the analysis of the fatty fraction of dry sausages, such as *chorizo*. NMR spectroscopy is known to be advantageous in fat analysis such as oil; however, high field NMR or derivatization strategies must be considered in order to achieve its full potential.

Our work aims to optimize the methodology of analysis in order to make it feasible for routine analysis of fats. Challenges such as detection limit and signal overlapping were overcome by means of adjusting adquisition parameters (number of scans, relaxation delay and heteroatom broadband decoupling) Additionally, a big improvement in resolution was achieved when using solvent mixtures involving hexadeuterodimethyl sulfoxide.

The new methodology allows the detection and quantification of diacylglycerides, monoacylglycerides, free fatty acids, and other minor components in one single, short experiment, as well as the characterization of the main constituents of the fat. We analyzed the evolution of *chorizo* fat along the whole ripening and storage time in actual manufacturing conditions. We compared the evolution of different batches of *chorizo*, including both minor composition changes (salt reduction, antioxidant addition) as well as major composition changes (meats from different breeds). We corroborated that the nature of meat affected the lipolysis evolution more than changes in ingredients.

In conclusion, this optimized analytical NMR methodology is simple and straightforward and can be easily applied to the monitoring of the evolution of dry sausages throughout the whole manufacturing process.

ÍNDICE

CAPÍTULO 1
INTRODUCCIÓN 1

1.1 EL ANÁLISIS DE ALIMENTOS 3
1.2 APLICACIONES DEL ANÁLISIS DE ALIMENTOS 5
1.3 COMPOSICIÓN DE LOS ALIMENTOS 6
1.4 MÉTODOS DE ANÁLISIS DE ALIMENTOS 7
1.5 PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO 9
1.6 VENTAJAS ASOCIADAS AL ESTUDIO 12
1.7 BIBLIOGRAFÍA 15

CAPÍTULO 2
ANTECEDENTES Y OBJETIVOS 17

2.1 LOS EMBUTIDOS 19
2.2 LAS GRASAS 23
2.3 DEGRADACIÓN DE LAS GRASAS 30
2.4 MÉTODOS DE ANÁLISIS DE LAS GRASAS 34
2.5 HISTORIA DE LA RMN 43
2.6 FUNDAMENTOS DE LA RMN 45
2.7 EL EQUIPO DE RMN 47
2.8 APLICACIONES DE RMN EN ANÁLISIS DE ALIMENTOS 49
2.9 ANÁLISIS DE GRASAS CON RMN 54
2.10 ANÁLISIS DE CARNES Y EMBUTIDOS CON RMN 56
2.11 OBJETIVOS 58
2.12 BIBLIOGRAFÍA 61

CAPÍTULO 3
OPTIMIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE RMN PARA EL ANÁLISIS DE EMBUTIDOS 63

3.1 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA 65
3.2 EXTRACTO LIPOSOLUBLE 66
3.3 SELECCIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN 69
3.4 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA PARA EL ANÁLISIS POR RMN 75
3.5 PARÁMETROS DE ANÁLISIS 76
3.6 LIMITACIONES DE LA TÉCNICA: SOLAPAMIENTOS 82
3.7 DESACOPLAMIENTO DE SEÑALES EN RMN 91
3.8 REACTIVOS DE DESPLAZAMIENTO 95
3.9 DERIVATIZACIÓN 96
3.10 INTERPRETACIÓN DEL ESPECTRO 101
3.11 CONCLUSIONES 103
3.12 BIBLIOGRAFÍA 104

CAPÍTULO 4
ESTRATEGIAS DE ANÁLISIS ALTERNATIVAS 107

4.1 EL DESPLAZAMIENTO QUÍMICO 109
4.2 EFECTO DE LA TEMPERATURA 111
4.3 EFECTO DEL DISOLVENTE 112
4.4 APLICACIÓN AL ANÁLISIS 128
4.5 CONCLUSIONES 137
4.6 BIBLIOGRAFÍA 138

CAPÍTULO 5
VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA 139

5.1 ANÁLISIS CUANTITATIVO 141
5.2 COMPARACIÓN FRENTE A MÉTODOS CLÁSICOS 142
5.3 EJEMPLO DE APLICACIÓN. MONITORIZACIÓN DE LA DEGRADACIÓN TÉRMICA DE ACEITES 147
5.4 BIBLIOGRAFÍA 153

CAPÍTULO 6
ANÁLISIS DE EMBUTIDOS POR RMN 155

6.1 ESTUDIO DE UN CICLO DE MADURACIÓN-SECADO DE EMBUTIDO 157
6.2 EFECTO DEL CAMBIO DE INGREDIENTES 161
6.3 EFECTO DEL CAMBIO DE MATERIA PRIMA CÁRNICA 167
6.4 DIFERENCIACIÓN DE MUESTRAS MEDIANTE PCA 170
6.5 BIBLIOGRAFÍA 177

CAPÍTULO 7
CONCLUSIONES 179

ABREVIACIONES

ADP	adenosín difosfato
AgFOD	2,2-dimetil-6,6,7,7,8,8,8-heptafluoro-3,5-octanodionato de plata (I)
AGL	ácido graso libre
AMP	adenosín monofosfato
AOAC	*Association of Official Analytical Chemists*
AOCS	*American Oil Chemists' Society*
AOM	método del oxígeno activo
AOVE	aceite de oliva virgen extra
ARA	ácido araquidónico
ASE	extracción acelerada con disolventes
ATP	adenosín trifosfato
BBI	*broadband inverse*
BBO	*broadband observe*
BTMSB	1,4-bis(trimetilsilil)benceno
C2	carbono 2 en las cadenas acílicas desde carbonilo
C3	carbono 3 en las cadenas acílicas desde carbonilo
CIELAB	espacio de color L*a*b* de la *Comission Int. de l´Éclairage*
CLA	ácido linolénico conjugado
CyOH	ciclohexanol
δ	desplazamiento químico
DAG	diglicérido
ddd	doblete de doblete de doblete
DHA	ácido docosahexaenoico
DMSO	dimetilsulfóxido
DMSO-d6	dimetilsulfóxido hexadeuterado
EPA	ácido eicosapentaenoico

FID	*free induction decay*
FTIR	espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier
GARP	Esquema de desacoplamiento, *globally-optimised, alternating-phase, rectangular pulses*
GC	cromatografía de gases
HPLC	cromatografía líquida de altas prestaciones
HRMAS	RMN para sólidos, *high resolution magic angle spinning NMR*
HTGLC	cromatografía gas líquido de alta presión
IR	espectroscopia de infrarrojo
IUPAC	*International Union of Pure and Applied Chemistry*
J_{H-C}	constante de acoplamiento protón-carbono
l	linoleico
ln	linolénico
m	monoinsaturados
MAG	monoacilglicerol o monoglicérido
MAS-NMR	resonancia magnética nuclear con giro en ángulo mágico
MeOH	metanol
MS	espectroscopia de masas
MTBE	éter metil *terc*-butílico
n-3	omega-3
NIR	espectroscopia de infrarrojo cercano
ns	número de barridos (*scans*)
PCA	análisis de componentes principales, *Principal Components Analysis*
PFE	extracción con fluidos presurizados
ppm	partes por millón
RMI	resonancia magnética de imagen
s	segundo o saturados
s/n	relación señal/ruido
sn-1	posición estereoespecífica 1 de glicerol
sn-2	posición estereoespecífica 2 de glicerol

sn-3	posición estereoespecífica 3 de glicerol
SNIF-NMR	fraccionamiento por posición específica de isótopos naturales por resonancia magnética nuclear
T1	tiempo de relajación longitudinal
TAG	triacilglicerol o triglicérido
TBARs	análisis de sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico
^{t}BuOH	tercbutanol
TD-NMR	resonancia magnética nuclear en dominio temporal
TMS	tetrametilsilano
u	insaturados
UV	espectrofotometria de ultravioleta

CAPÍTULO 1
INTRODUCCIÓN

Contenido

1.1 EL ANÁLISIS DE ALIMENTOS 3
1.2 APLICACIONES DEL ANÁLISIS DE ALIMENTOS 5
1.3 COMPOSICIÓN DE LOS ALIMENTOS 6
1.4 MÉTODOS DE ANÁLISIS DE ALIMENTOS 7
1.5 PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO 9
1.6 VENTAJAS ASOCIADAS AL ESTUDIO 12
1.7 BIBLIOGRAFÍA 15

"Somos lo que comemos"

Ludwig Feuerbach

El presente trabajo trata sobre una técnica espectroscópica de análisis, la resonancia magnética nuclear (RMN) y su aplicación en el estudio de un tipo concreto de alimentos, como son los embutidos tradicionales. Como todo trabajo de investigación, entraña un desafío: explorar los límites de la técnica analítica para adaptarla y optimizarla; para extraer el máximo potencial y obtener más información, más conocimiento y más resultados para conocer mejor las características, las propiedades, las fortalezas y debilidades del alimento. El reto de conseguir más por menos.

Antes de presentar el planteamiento de este estudio, comenzaremos con una breve introducción para contextualizar el análisis de los alimentos, sus utilidades y sus metodologías.

1.1 EL ANÁLISIS DE ALIMENTOS

Los alimentos son materiales de origen vegetal o animal que contienen nutrientes esenciales necesarios para proporcionar energía, permitir el crecimiento y mantener la vida. Los alimentos son muy importantes no sólo porque satisfagan la necesidad de comer sino también por su relación con la salud. Una dieta equilibrada aporta numerosas ventajas en la prevención de enfermedades y en el bienestar general del individuo. La relación entre alimentación y salud ya se intuía desde la antigüedad, e Hipócrates acuñó la frase: "Sea el alimento tu medicina y la medicina tu alimento".

Puesto que la alimentación es una faceta relevante en nuestra vida, merece ser estudiada al detalle en todos sus aspectos. El **análisis de alimentos** se encarga de la caracterización de las propiedades de los alimentos y sus componentes.

Del análisis de los alimentos se extrae información sobre diversas características tales como composición, estructura, propiedades fisicoquímicas y atributos sensoriales. Esta información es crucial para entender los factores que determinan las propiedades de los alimentos y permite garantizar alimentos seguros, nutritivos y deseables. Asimismo, facilita las herramientas para elegir y confeccionar dietas adecuadas.

La importancia de los alimentos no se limita al plano de la nutrición y de la salud, sino que también tienen gran relevancia en el plano económico (sector agroalimentario) e incluso en el plano cultural (gastronomía). Por todo ello, existen reglamentos y regulaciones diseñados para:

- mantener unos mínimos de calidad
- garantizar la seguridad
- asegurar la autenticidad
- evitar el fraude
- garantizar la información al consumidor

El análisis de alimentos juega un papel importante a la hora de fundamentar los requisitos exigibles por las regulaciones y también a la hora de verificarlos.

El análisis de alimentos abarca los planos composicional, estructural, físico-químico y sensorial. El análisis composicional puede realizarse a niveles muy diferentes, yendo desde lo más macroscópico a lo más microscópico. Así, el análisis puede ocuparse de la composición en ingredientes (nueces, leche), de la composición en tipos de moléculas (grasas, proteínas, fibra), de moléculas específicas (tocoferol, agua) o de átomos concretos (sodio). Algo similar sucede con el análisis estructural, que puede limitarse al plano macroscópico (gránulos de sal, burbujas de aire), microscópico (emulsión, agregados proteicos, cristalizados) o molecular (estructura tridimensional e interacciones). En el análisis de propiedades físico-químicas se analizan aspectos como la óptica (color), la reología (textura) o el pH. Por último, el análisis sensorial permite caracterizar las propiedades de los alimentos que están más vinculadas con los sentidos y la aceptación del consumidor.

1.2 APLICACIONES DEL ANÁLISIS DE ALIMENTOS

Los alimentos están presentes en muchas de las facetas de la vida: nutrición, salud, placer, cultura, economía, etc. En consonancia, y en relación con todos estos aspectos, existen múltiples aplicaciones del análisis de alimentos.

En materia de seguridad alimentaria, es crucial contar con las herramientas que garanticen que el alimento no presenta riesgos para la salud. El análisis de alimentos puede orientarse a la búsqueda de las sustancias peligrosas tales como toxinas, residuos químicos (hormonas, pesticidas…) o materias extrañas (madera, metales…). Asimismo, una importante rama del análisis de alimentos investiga la presencia de microorganismos perjudiciales en el alimento, tanto porque degraden las propiedades del alimento como por su carácter patógeno y riesgo de enfermedades.

El etiquetado nutricional es de obligado cumplimiento en la mayoría de los países y afecta a muchos tipos de alimentos. Los reglamentos pueden obligar a declarar valor energético, contenido en grasa (y en grasa saturada), colesterol, sodio, carbohidratos (azúcares), fibra, proteína, vitaminas, etc. Asimismo, el etiquetado nutricional es obligatorio cuando el fabricante indica alegaciones nutricionales o de salud en la etiqueta del alimento.

La autenticidad del alimento puede ser confirmada mediante análisis, para tratar de evitar los fraudes que intentan engañar al consumidor mediante la suplantación de ingredientes o del origen geográfico.

Alimentos con cierta relevancia gastronómica o con valor añadido están protegidos por normas de calidad, donde la identidad, calidad o categoría pueden ser acreditadas gracias al análisis.

El análisis de alimentos no sólo es importante desde el punto de vista de la protección del consumidor, sino que también es muy importante para la industria alimentaria. Para lograr competitividad, las empresas se enfrentan al desafío de producir alimentos de calidad a bajo precio y, al mismo tiempo, garantizar que sus productos sean apetitosos, seguros, nutritivos, saludables… La herramienta que permite a las empresas cumplir constantemente con los requisitos es el control de

calidad y se lleva a cabo mediante el análisis de las materias primas, la monitorización durante el proceso y la caracterización del producto final.

Asimismo, el desarrollo por parte de las empresas de nuevos productos que satisfagan las demandas del consumidor (nuevos ingredientes, contenidos reducidos de sal/grasa/azúcar…) requiere del apoyo del análisis de alimentos. Tanto en la innovación de productos como de procesos es requisito indispensable medir el efecto que los cambios introducidos tienen sobre las propiedades o características del alimento. Y es ahí donde el análisis de alimento juega un papel fundamental.

1.3 COMPOSICIÓN DE LOS ALIMENTOS

Existen muchas técnicas de análisis diferentes, la mayoría de ellas orientadas o especializadas en la detección o cuantificación de diferentes componentes de los alimentos. Químicamente hablando, los alimentos, salvo contadas excepciones son mezclas de sustancias muy dispares, donde coexisten moléculas de bajo peso molecular con polímeros de alto peso molecular, cuyas secuencias son complejas y no siempre repetitivas. Algunas sustancias están presentes en proporciones importantes y, a la vez, coexisten con otros componentes minoritarios cuya abundancia es miles o millones de veces inferior. Paradójicamente, estos componentes minoritarios suelen ser muy relevantes en cuanto a propiedades del alimento, pero su detección está enmascarada por las sustancias mayoritarias presentes.

En los alimentos se distingue un tipo de sustancias que están presentes de forma mayoritaria y se denominan macronutrientes, en contraposición con los micronutrientes, que son las sustancias minoritarias.

Los macronutrientes suponen la práctica totalidad de la ingesta y son los responsables del aporte energético y del aporte estructural para el crecimiento. Lo componen el agua, los hidratos de carbono, los lípidos y las proteínas. Dentro de la familia de los hidratos de carbono conviven moléculas pequeñas (monosacáridos, disacáridos) y polímeros de alto peso molecular, donde se incluyen los almidones y

las fibras. El grupo de los lípidos lo forman, principalmente, las grasas, donde se incluyen los triglicéridos y, en menor cantidad, monoglicéridos, diglicéridos y ácidos grasos libres. Otros lípidos son los esteroles y los fosfolípidos. Las proteínas son moléculas de alto peso molecular formadas por cadenas largas de aminoácidos. Los péptidos y aminoácidos libres (minoritarios en los alimentos) se suelen incluir en el grupo de las proteínas.

Los micronutrientes están presentes en cantidades muy pequeñas y, en ocasiones, a nivel de trazas. Son muy importantes pues son necesarios para el funcionamiento del metabolismo y están relacionados con la producción de hormonas y enzimas. Aunque son necesarios en pequeñas cantidades, su déficit puede provocar problemas de salud. Dentro de los micronutrientes podemos destacar las vitaminas y los minerales.

En definitiva, en lo concerniente a composición, los alimentos son mezclas muy complejas, con sustancias de propiedades muy diferentes y en muy diferentes proporciones. Esta particularidad dificulta enormemente el análisis, pues obliga, casi siempre, a tener que recurrir a etapas de **preparación de muestra**, donde se separan o discriminan componentes. Normalmente, se requiere de la combinación de varias técnicas de análisis para lograr una información más o menos completa acerca de la composición del alimento.

1.4 MÉTODOS DE ANÁLISIS DE ALIMENTOS

Muchos y muy variados son los métodos de análisis que pueden aplicarse al estudio de los alimentos. Cada método aporta información acerca de uno o varios aspectos concretos del alimento y ningún método es capaz, por sí solo, de aportar una información global y absoluta. Numerosas técnicas de análisis se han puesto al servicio del análisis de alimentos, siendo algunas de ellas muy simples y básicas y otras mucho más complejas y sofisticadas.

Entre las técnicas de análisis más simples está aquella que nos permite juzgar atributos como aspecto, aroma, sabor y textura usando nuestros propios sentidos. El análisis sensorial, pese a su intrínseca subjetividad, aporta información útil y

veraz siempre que exista un suficiente número de datos y adecuado tratamiento e interpretación de los mismos.

Las técnicas clásicas de análisis, también conocidas como vía húmeda, se basan en operaciones típicas de laboratorio como extracciones, precipitaciones, cristalizaciones, filtraciones, evaporaciones, destilaciones, derivatizaciones, hidrólisis, digestiones, volumetrías o gravimetrías. Técnicas clásicas de este estilo ya se utilizaban en el siglo XIX. Algunos ejemplos conocidos son el método Kjeldahl de análisis de proteínas, que supone una digestión ácida seguida de una destilación y una volumetría. O el método Soxhlet de análisis de grasas, que incluye una desecación y una extracción líquido-sólido, seguida de evaporación y gravimetría.

El salto de las técnicas clásicas a las técnicas instrumentales estuvo condicionado a los avances tecnológicos. Conforme se iban aplicando los desarrollos en semiconductores, microelectrónica, computación, láseres, etc., se obtenían nuevos instrumentos con capacidades de análisis mejoradas.[1]

En primer lugar, los avances en electrónica permitieron el desarrollo de la potenciometría y nacieron los medidores de pH (1934). Posteriormente, el desarrollo de la espectrofotometría permitió la aplicación de detectores de ultravioleta (UV) (1941) y de infrarrojo (IR) (1944) al estudio de los alimentos. Más adelante la cromatografía dio un salto cualitativo y los primeros equipos de cromatografía gaseosa (GC) con detector de conductividad térmica estuvieron disponibles ya en 1955 mientras que en 1967 aparecieron los primeros equipos de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

La espectrometría de masas (MS) ya contaba con equipos comerciales desde 1942, pero eran demasiado grandes, complejos y costosos y eran destinados a elucidación estructural principalmente y no a análisis de alimentos. No fue hasta finales de los 60 cuando equipos de MS se implementaron como detectores de GC y su potencial analítico despegó. En los años 80 ya estaban disponibles equipos de sobremesa GC-MS. Este ejemplo de combinación de técnicas fue la antesala para el desarrollo de otras técnicas combinadas (*hyphenated*).

También en los años 40 se desarrolló la espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN), aunque hubo que esperar hasta los años 60 para encontrar equipos

comerciales. No obstante, estos equipos pioneros tenían prestaciones bastante limitadas. Los primeros equipos se usaron, principalmente, para identificación estructural de moléculas; ya que la técnica RMN es muy poderosa en este aspecto. El verdadero despegue de la RMN no tuvo lugar hasta finales del siglo XX, donde gracias a la aplicación de materiales superconductores y del aumento de capacidad de cálculo informático se consiguieron equipos de altas resoluciones que aprovechan al máximo el potencial analítico de la técnica.

De entre todas las técnicas disponibles, las técnicas espectroscópicas aportan ciertas ventajas en análisis de alimentos: suelen requerir de una mínima preparación de muestra, proporcionan resultados rápidamente y pueden identificar múltiples analitos en un único experimento. En resumen, tienen un enorme potencial a la hora de ofrecer más información y resultados de forma rápida y sencilla. Estas ventajas son especialmente útiles cuando pensamos en análisis de rutina composicional para control de calidad de ingredientes, productos intermedios o productos finales.

La RMN es una técnica clave en identificación estructural de moléculas y desde hace unas décadas también en análisis de mezclas. Aunque no es tan sensible como la MS, aporta numerosas ventajas como facilidad en la preparación de muestra, detección e identificación de múltiples analitos por muestra y tiempos de análisis relativamente cortos. Además, por lo general, no es necesario derivatizar la muestra, por lo que se mantiene inalterada.

1.5 PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO

Los **embutidos** que tradicionalmente conocemos en España como “curados” son productos cárnicos sometidos a un proceso de maduración y secado que les confiere unas características de textura y sabor particulares. Desde el punto de vista composicional, son alimentos muy ricos en proteínas y grasas. La grasa del embutido juega un rol protagonista en el perfil sensorial y contribuye notablemente al sabor, textura y palatabilidad del producto. Originalmente concebidos como una estrategia de conservación de la carne, hoy en día se mantiene su elaboración

debido a las características organolépticas tan características de estos productos, que los hace muy apetecibles y demandados.

Hoy en día, la elaboración industrial de estos productos reproduce, en gran medida, los procedimientos **tradicionales**. El mero hecho de ser tradicional no significa que sea simple ni sencillo, pues a lo largo del proceso tienen lugar numerosas y variadas transformaciones tales como fermentación, deshidratación, oxidación, lipólisis, proteólisis, etc. Es un proceso vivo. El control de todas las transformaciones que tienen lugar durante el proceso requeriría del uso de múltiples técnicas de análisis que lo complicarían y encarecerían, por lo que, en la práctica, no suelen ser estudiadas ni monitorizadas de forma rutinaria. El seguimiento del proceso es, por tanto, escaso; limitándose al control de puntos críticos de proceso y a ciertos análisis simples sobre producto final. Las empresas suplen esta falta de información confiando en su experiencia y *know-how*.

En un mercado competitivo, donde una calidad constante y una clara diferenciación son cruciales, la complejidad de los procesos involucrados en la trasformación del embutido puede dificultar la consecución de una homogeneidad y constancia a lo largo de la producción. Los fabricantes se encuentran, por tanto, en un cierto estado de vulnerabilidad, pues no siempre se logra evitar problemas, defectos, o heterogeneidad en la producción sólo en base a la experiencia, por muy amplia que sea.

Además, las limitaciones en la capacidad de monitorización y seguimiento del proceso complican enormemente la introducción de cambios, mejoras o innovaciones. Cualquier intervención sobre el proceso debe ser ejecutada de manera paulatina y gradual, pues el margen de maniobra es escaso y la capacidad de anticipación es limitadísima. Se desincentiva la innovación en materias primas, modernización de etapas de proceso, etc.

Sería interesante poder contar con una alternativa de análisis rápida, sencilla y eficiente que facilitara la monitorización del proceso de transformación de embutidos. Por eso, este estudio propone la aplicación de una técnica de análisis espectroscópica como la RMN en el análisis de la fracción grasa del embutido.

La RMN es una técnica de análisis con un interesante potencial. En sus orígenes, la técnica estuvo dedicada, casi exclusivamente, al estudio de la elucidación estructural de moléculas. Como ha sido comentado, gracias al desarrollo de imanes, materiales semiconductores y de la informática, se consiguió ampliar su campo de aplicación. Se trata de una técnica muy versátil que últimamente está siendo aplicada con éxito en análisis de alimentos.

Las principales ventajas de la RMN frente a otras técnicas radican, principalmente en una buena sensibilidad multianalito en un solo experimento que permite la caracterización tanto cualitativa como cuantitativa de forma rápida. Además, la preparación de la muestra previa al análisis es relativamente simple, evitando separaciones previas. Incluso en el caso en que se requieran derivatizaciones, éstas pueden ser realizadas *in situ*, de manera fácil y rápida. La versatilidad y rapidez de la técnica le confieren ventajas como herramienta de control de calidad y seguridad alimentaria.

Aplicada al mundo de los embutidos, la técnica puede proporcionar de forma rápida y sencilla información sobre el tipo de grasa y el grado de insaturación. Gracias a esto se facilita, por ejemplo, el cumplimiento de la ley de etiquetado que a día de hoy precisa de análisis relativamente costosos. Tener rápido acceso al análisis composicional puede mejorar enormemente el control de calidad de la materia prima cárnica y su selección. Asimismo, se abre la posibilidad de mejorar el perfil nutricional del producto final mediante la discriminación e incorporación de grasas de composición más saludables (mayor contenido en omega-3, por ejemplo) o evitando las perjudiciales (*trans*).

La RMN podría, también, identificar compuestos minoritarios indicadores del proceso de lipólisis u oxidación, íntimamente vinculados a la calidad y al perfil organoléptico resultante del producto, lo cual facilitaría la monitorización y el seguimiento de los procesos de maduración.

También es relevante el papel de la RMN como posible herramienta de innovación, facilitando la identificación de mejoras de producto, pues su potencial analítico y su capacidad de monitorización son indispensables para poder, de forma sencilla, medir las implicaciones y efectos de cualquier innovación que se ensaye; como por

ejemplo cambios de ingredientes, proporciones en la formulación, parámetros de proceso, etc.

1.6 VENTAJAS ASOCIADAS AL ESTUDIO

La aplicación de la RMN al análisis de embutido proporcionaría numerosas ventajas. Permitiría facilitar la implementación de una monitorización del proceso más extensiva, redundando en una mayor **calidad** y permitiendo a la empresa ganar en **diferenciación** y **valor añadido**.

Los análisis mediante técnicas de RMN, comparados con las técnicas de análisis convencionales, permiten simplificar la preparación de la muestra y reducir costes y tiempos de análisis. Se trata de una herramienta que puede proporcionar muchísima información y que permite un control minucioso sobre el proceso, evitando eventuales pérdidas por partidas defectuosas o devoluciones.

Gracias a la implantación de la técnica en el análisis de embutidos se facilitaría notablemente el proceso de innovación de producto en tanto en cuanto se simplifica enormemente la medición del efecto que causan en el producto todas aquellas innovaciones introducidas. Por ejemplo, el efecto que tendrían carnes con un perfil graso más insaturado en la evolución de los aromas a curado o las implicaciones en el desarrollo del defecto de rancidez.

En toda España la cifra de producción de embutidos curados se eleva por encima de las 200.000 toneladas. El subsector de los embutidos curados supone casi un 15% del total de productos cárnicos elaborados. Adicionalmente, no debemos olvidar que los resultados de este estudio podrían ser fácilmente extrapolables, a corto plazo, al proceso de maduración-secado de jamón y paleta, lo cual incrementaría notoriamente el mercado potencial de la técnica, sumando una producción adicional de más 300.000 toneladas. [2]

Las ventajas de la implementación del análisis RMN supondrían:

- Mejora de la información disponible acerca del proceso. Acceso a herramientas de análisis más rápidas y eficientes sin elevado sobreprecio.
- Mejora de calidad de producto, gracias a un mayor control del proceso
- Incremento del valor añadido del producto. Capacidad de diferenciación basada en la calidad y una producción muy homogénea y estable.
- Mejora de competitividad gracias a la reducción de costes por partidas defectuosas o devoluciones cliente.
- Potencial futuro y capacidad de desarrollar innovaciones de producto de manera más sencilla y organizada. La capacidad de monitorización intensiva supone una ventaja diferenciadora e innovadora en optimización de materias primas y formulación o en optimización de parámetros de proceso y transformación.

En definitiva, es esperable que los resultados se pudieran trasladar a una serie de beneficios, que se pueden clasificar en:

- **Beneficios productivos** logrados mediante a un mayor **control y conocimiento** de los fenómenos que se desarrollan en el interior del producto como consecuencia del proceso de maduración-secado. Este conocimiento ayudaría a definir y ajustar los límites de calidad deseados o requeridos. Permitiría una producción más homogénea y estable.
- **Beneficios económicos** en comparación con los procedimientos analíticos convencionales, una monitorización profunda del proceso podría llevarse a cabo sin que la repercusión económica de los servicios analíticos desfavoreciera el proceso. Además, desde el punto de vista **preventivo**, la aplicación de la técnica permitiría a la empresa disminuir la incidencia de lotes o partidas defectuosas e incluso evitar devoluciones de producto.
- **Beneficios estratégicos** con respecto a **imagen, marca** e **innovación**. La innovación de producto es una de las estrategias de empresa encaminada

a ganar **competitividad** en el mercado mediante **ahorro** de costes o bien a través de la **diferenciación**.

1.7 BIBLIOGRAFÍA

(1) Mcgorrin, R. J. One Hundred Years of Progress in Food Analysis. *J. Agric. Food Chem* **2009**, *57*, 8076–8088.

(2) ANICE. El sector cárnico español https://www.anice.es/industrias/area-de-prensa/el-sector-carnico-espanol_213_1_ap.html (accessed Aug 19, 2019).

CAPÍTULO 2
ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Contenido

2.1 LOS EMBUTIDOS 19
2.2 LAS GRASAS 23
2.3 DEGRADACIÓN DE LAS GRASAS 30
2.4 MÉTODOS DE ANÁLISIS DE LAS GRASAS 34
2.5 HISTORIA DE LA RMN 43
2.6 FUNDAMENTOS DE LA RMN 45
2.7 EL EQUIPO DE RMN 47
2.8 APLICACIONES DE RMN EN ANÁLISIS DE ALIMENTOS 49
2.9 ANÁLISIS DE GRASAS CON RMN 54
2.10 ANÁLISIS DE CARNES Y EMBUTIDOS CON RMN 56
2.11 OBJETIVOS 58
2.12 BIBLIOGRAFÍA 61

"Un objetivo sin un plan es sólo un deseo"

Antoine de Saint-Exupéry

2.1 LOS EMBUTIDOS

El embutido tradicionalmente conocido como *embutido curado* (chorizo, salchichón, fuet, etc…) es un producto cárnico troceado al que se la añaden sal y algunos otros ingredientes (especias, conservadores, etc.) y que es sometido a proceso de maduración-secado tras ser introducido en un envoltorio permeable (tripa) natural o artificial.

Originalmente concebidos como una estrategia de conservación de la carne, hoy en día se mantiene su elaboración debido a las características organolépticas tan características de estos productos, que los hace muy apetecibles y demandados. La elaboración industrial de estos embutidos mantiene la esencia del proceso tradicional. En esencia, el proceso de elaboración de embutido curado consta de cinco fases, picado, amasado, embutición, maduración-secado y envasado. (Figura 2.1).

Figura 2.1: Esquema del proceso de elaboración de embutido madurado-secado.

Durante el proceso de maduración-secado tienen lugar diferentes fenómenos que confieren al producto sus características finales:

- Fermentación: la microflora natural (o añadida) fermenta la masa cárnica, logrando una bajada de pH y provocando que la proteína se desnaturalice y coagule, generando el fenómeno de ligazón. La actividad de la flora, su metabolismo, genera sustancias como el ácido láctico o algunos productos de proteólisis y lipólisis que son responsables del perfil sensorial característico del producto

- Deshidratación: durante la estancia en secadero, el producto pierde humedad gracias a la porosidad de la tripa (natural o artificial) en la que se encuentra embutido. La pérdida de humedad favorece la conservación del alimento (favorece su estabilidad microbiana) a la vez que confiere propiedades típicas de textura.

- Maduración: diferentes procesos enzimáticos provocan proteólisis y lipólisis, generando sustancias aromáticas características del flavor[1] curado. El perfil sensorial del producto vira desde descriptores típicos de carne fresca (metálico, amargo, sangre) hacia descriptores típicos de carne madurada-secada (umami, curado, añejo, frutos secos).

- Oxidación. Durante el tiempo de maduración-secado el producto está en contacto con el oxígeno ambiental, el cual es capaz de promover reacciones de oxidación que tienen como resultado nuevas especies (aldehídos, cetonas, ácidos carboxílicos) que afectan al perfil sensorial. Cantidades incipientes de subproductos de oxidación son bien aceptadas por el consumidor y constituyen el atributo conocido como añejo. El exceso de oxidación, por el contrario, desencadena en sabores mucho más intensos que son reconocidos como el flavor rancio y se consideran defecto.

La monitorización del proceso y todas las variables involucradas puede llevarse a cabo utilizando técnicas de análisis bien conocidas y establecidas. Sin embargo,

[1] En análisis sensorial, flavor es el término que se utiliza para denominar al conjunto de percepciones de sabor y aroma

muchos de los análisis son complejos y costosos en tiempo y dinero, lo cual se traduce en que el control de calidad habitual que se lleva a cabo en las empresas se limita a registrar ciertos puntos de control tales como tiempos, temperaturas de proceso y control de mermas; y a realizar periódicamente análisis físico-químicos y microbiológicos de producto final, generalmente para comprobar que el alimento se encuentra dentro de los límites exigidos por la normativa. Es decir**, no se realiza una monitorización exhaustiva de las materias primas ni la evolución del proceso por resultar ésta demasiado compleja y cara**. En la práctica, las empresas gestionan su calidad simplemente basándose en el seguimiento de algunos puntos críticos de control y, principalmente, en su experiencia y "*know-how*" sobre el proceso tradicional.

Las técnicas analíticas convencionales y establecidas (Reglamento de ejecución (UE) nº 1348/2013 de la Comisión) que deberían ser usadas a la hora de monitorizar exhaustivamente la evolución del proceso serían las siguientes:

- Análisis de ácidos grasos, composición y relación de saturados vs. insaturados: se aplica la cromatografía de gases, precedida por una preparación de muestra que incluye una etapa de transesterificación. La medida del índice de yodo (volumetría) también permite cuantificar el grado de insaturación de una grasa.

- Medida del grado de hidrólisis de los lípidos: se usan análisis como la medida de acidez libre (volumetría).

- Evolución de la oxidación: se aplican análisis como el índice de peróxidos (volumetría) o el índice TBARs de sustancias reactivas al tiobarbitúrico (espectrofotometría)

Poder simplificar la metodología de análisis es uno de los objetivos de este proyecto. Mediante el uso de una sola técnica, la Resonancia Magnética Nuclear, podríamos ser capaces de obtener la misma información que mediante la aplicación de todas estas otras técnicas, de manera más simple, sencilla, rápida y económica.

Las grasas en el embutido

En embutidos como el chorizo o el salchichón, la grasa es un componente muy importante que está presente en proporciones del 30% o mayores, por lo que influye de forma destacada en las características del producto final. El protagonismo de la grasa se nota mucho en atributos del embutido como la cohesión, firmeza, sabor, palatabilidad, jugosidad y estabilidad durante la conservación.[1] Asimismo, la naturaleza de la grasa afecta al desarrollo de la maduración y el secado.

La calidad de la grasa de cerdo está definida por sus características nutricionales y físicas, las cuales están íntimamente ligadas a la composición. Así, propiedades como consistencia (firmeza/blandura), color, o susceptibilidad frente a oxidación se relacionan con el balance entre ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados.[2]

Numerosos son los factores que afectan a la calidad de la grasa como materia prima.[3] Muchos de ellos dependen del animal, como raza,[4,5] edad,[6] peso[7] o sexo.[8] La alimentación que recibe el animal juega un papel fundamental, puesto que los cerdos, como animales monogástricos que son, incorporan directamente los ácidos grasos de la dieta a su tejido adiposo. También afectan a la calidad de la grasa otros factores como las condiciones de cría y engorde[9] (estabulación, régimen intensivo, extensivo, temperatura[10]). Por último, conviene recordar que las características de la grasa también varían en función de la parte anatómica de la que proviene, encontrándose diferencias, por ejemplo, entre papada, tocino dorsal o panceta.

Desde el punto de vista tecnológico, las grasas firmes son las más indicadas para la elaboración de embutidos madurados-desecados. Las grasas blandas y con bajo punto de fusión se deforman o funden durante las operaciones de picado y amasado y pueden recubrir los trozos de carne magra (defecto de embarrado) y dificultar la deshidratación, desfavorecer la cohesión (ligado) y producir productos finales con textura muy blanda.[11,12] Las grasas blandas también favorecen la aparición de defectos de rancidez.[13]

A continuación, se describirán con más detalle las particularidades de las grasas.

2.2 LAS GRASAS

Los lípidos son una familia de compuestos orgánicos que incluye ácidos grasos, monoglicéridos, diglicéridos, triglicéridos, fosfolípidos, eicosanoides, resolvinas, docosanoides, esteroles, carotenoides, vitaminas A y E, alcoholes grasos, hidrocarburos y ceras. Antiguamente, se definían los lípidos como aquellas sustancias solubles en disolventes orgánicos, pero hoy en día se definen como pequeñas moléculas hidrofóbicas o anfifóbicas cuya biosíntesis es realizable enteramente o en parte por la condensación de tioésteres o unidades de isopreno.[14]

La **grasa** es un término genérico para designar a los lípidos aunque se refiere, principalmente a los acilgliceroles, que están formados fundamentalmente por los triglicéridos y en menor cantidad por los productos de lipólisis como los monoglicéridos y diglicéridos (Figura 2.2). En los alimentos, la mayor parte de la fracción lipídica está compuesta por las grasas. Las grasas constituyen la principal fuente de energía pues son el macronutriente con mayor densidad energética (37 kJ/g). No sólo son relevantes desde el punto de vista calórico, sino que son necesarias para la construcción de las membranas celulares o las vainas de mielina del sistema nervioso. También ayudan a la absorción de importantes micronutrientes, como las vitaminas liposolubles A, D, E y K. Sin embargo, algunos tipos concretos de grasa, cuando se consumen en exceso, están asociados a problemas como coágulos sanguíneos o inflamación crónica.

Las grasas son la forma más eficiente de acumular energía en el organismo y forman el tejido adiposo. Estructuralmente, el tejido adiposo protege los órganos internos y contribuye al aislamiento y al mantenimiento de la temperatura. También produce hormonas importantes en la función metabólica.

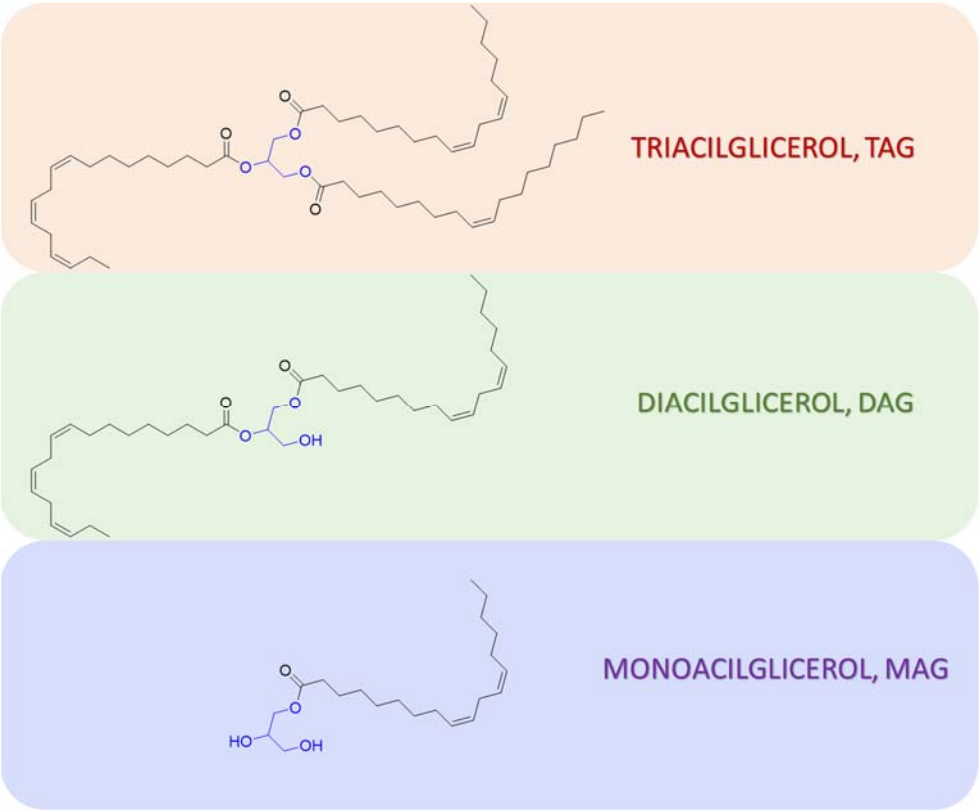


Figura 2.2: Ejemplos de acilgliceroles; triacilglicerol, diacilglicerol y monoacilglicerol.

2.2.1 FUNCIONES DE LAS GRASAS EN LOS ALIMENTOS

Más allá de su naturaleza energética, las grasas desempeñan un gran número de funciones en los alimentos gracias a algunas de sus propiedades inherentes como la hidrofobicidad o el punto de fusión.

Textura: El punto de fusión de la grasa condiciona que el alimento sea sólido (tocino) o líquido (aceite). En alimentos como el chocolate, interesa que el alimento sea sólido a temperatura ambiente pero se funda con la temperatura de la boca.

La grasa permite modular las masas de harina para que no resulten elásticas sino quebradizas (galletas, hojaldre). Este efecto se consigue cuando la grasa recubre a la harina e impide la formación de redes de gluten.

Mediante la formación de emulsiones, la grasa aporta textura cremosa en alimentos como el helado o la mayonesa.

Es muy útil a la hora de estabilizar texturas espumosas o esponjosas, como en el caso de la nata montada o el bizcocho.

Aspectos sensoriales: A nivel visual, la grasa puede aportar brillo a la superficie del alimento y también puede participar en el desarrollo de colores dorados y tostados al cocinar. Gracias a su índice de refracción hace que la leche sea opaca.

En boca, la grasa aporta lubricidad, cremosidad y palatabilidad. La grasa no sólo aporta sabor propio, sino que además es capaz de absorber otros aromas (la mayoría de compuestos que aportan aromas son liposolubles). La forma en que la grasa recubre la lengua a la vez que libera los aromas aporta una interesante experiencia gustativa.

Transferencia de calor: La grasa es muy estable y soporta temperaturas altas. Esto permite que sea usada como medio en operaciones de transferencia de calor como la fritura. La transferencia de calor es muy rápida y eficiente y permite resultados crujientes.

Conservación: Las grasas, al no aportar el agua necesaria para el desarrollo de la vida, inhiben el crecimiento microbiano. Eso las convierte en un medio apropiado para la conservación. Tradicionalmente se han utilizado para la conserva de carne en confit, o para el enlatado de pescado en aceite.

2.2.2 COMPOSICIÓN DE LAS GRASAS

Desde el punto de vista **composicional**, la grasa está formada en su práctica totalidad por triglicéridos. Químicamente son triésteres de glicerol con tres ácidos

carboxílicos de cadena larga (ácidos grasos) que pueden ser iguales o no. La molécula de glicerol cuenta con tres grupos hidroxilo unidos a, respectivamente, cada uno de los carbonos. Los tres carbonos suelen ser nombrados de manera estereoespecífica (*stereospecific numbering*, *sn*), refiriendo como *sn*-1 el carbono que aparece en la parte superior de la proyección de Fischer (cadena carbonada en vertical, hidroxilo central a la izquierda). El carbono central se nombra como *sn*-2 y el inferior como *sn*-3 (Figura 2.3). Este sistema permite asignar la configuración al carbono central cuando los dos hidroxilos primarios están esterificados con diferentes ácidos grasos. Por ejemplo, de acuerdo con esta nomenclatura, los monoacilgliceroles (MAG) cuyo único ácido graso está unido a la posición central o *sn*-2 son nombrados como 2-MAG, y los diacilgliceroles (DAG) con las posiciones *sn*-1 y *sn*-3 esterificadas son referidos como 1,3-DAG.

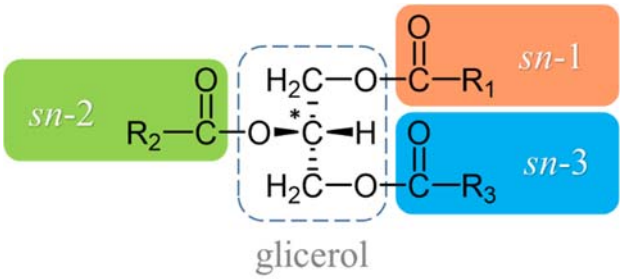


Figura 2.3: Nomenclatura estereoespecífica de las posiciones de los sustituyentes en los acilgliceroles.

Los ácidos grasos pueden ser de varios tipos, dependiendo de su longitud, insaturación, etc.[15] En función de la longitud de la cadena acílica, que puede variar desde 4 hasta 26 carbonos, se clasificarían en ácidos grasos de cadena corta (4-6 carbonos, ácido butírico, p. ej.), media (6-12, ácido caproleico, p. ej.), larga (13-21) o muy larga (>22). Los más abundantes son los ácidos grasos de cadena larga, principalmente entre 16 y 18 carbonos, donde abundan el ácido palmítico, esteárico, oleico, linoleico y linolénico (Tabla 2.1).

Los ácidos grasos también se clasifican en función de la presencia y número de dobles enlaces a lo largo de la cadena. Esto distingue entre ácidos grasos saturados

e insaturados, los cuales, a su vez, pueden ser mono- o poliinsaturados. Los dobles enlaces en los poliinsaturados aparecen en posiciones próximas con un único carbono alílico entre ellas y, salvo algunas excepciones, nunca conjugados.

Las insaturaciones condicionan el punto de fusión de las grasas; las saturadas son sólidas a temperatura ambiente mientras que las insaturadas son líquidas. Asimismo, los dobles enlaces son más reactivos, lo que condiciona su susceptibilidad a la degradación. También tienen una especial importancia en nutrición. Desde el punto de vista dietético, las grasas insaturadas son más recomendables, en especial aquellas cuyas insaturaciones están más próximas al extremo de la cadena acílica: las conocidas como omega-3 (n-3), que presentan un doble enlace en el carbono 3 contando desde el metilo del extremo final de la cadena.

Existen ácidos grasos esenciales y no esenciales. El metabolismo humano posee la capacidad de transformar las cadenas de los ácidos libres y acortarlas, elongarlas o insaturarlas selectivamente. Sin embargo, está limitado por la incapacidad de crear dobles enlaces más allá del carbono 9. Aquellos ácidos grasos necesarios para la función vital pero que no pueden ser sintetizados por el metabolismo humano se definen como esenciales y son el ácido linolénico (n-3) y el ácido linoleico (n-6); que incorporan insaturaciones más allá del carbono 9 y que sirven como material de partida para la síntesis de otras grasas más complejas como el ácido araquidónico (ARA), ácido eicosapentaenoico (EPA) o ácido docosahexaenoico (DHA).

En la Tabla 2.1 se recogen los ácidos grasos que más comúnmente aparecen en las grasas de los alimentos. De entre ellos, palmítico, esteárico, oleico, linoleico y linolénico son los más abundantes y frecuentes.

El isómero del ácido oleico con el doble enlace *trans* en vez de *cis* se conoce como ácido elaídico. En la naturaleza, los dobles enlaces en las cadenas acílicas son siempre de tipo *cis*; con la excepción de las grasas provenientes de carne o leche de rumiantes, donde puede encontrarse hasta un 3% de grasas *trans*. También pueden encontrarse grasas *trans* en alimentos que han sido sometidos a ciertos tratamientos, como por ejemplo procesos de fritura, de refinado o de hidrogenación. Las grasas de tipo *trans* son muy poco saludables y son perniciosas

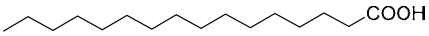
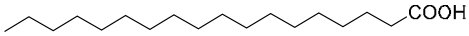
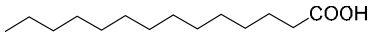
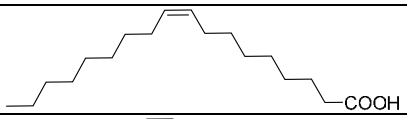
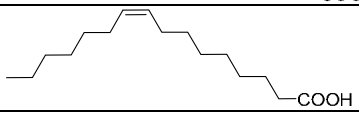
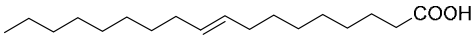
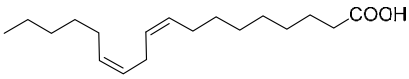
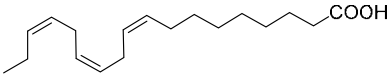
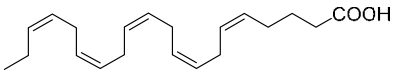
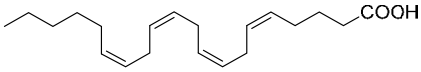
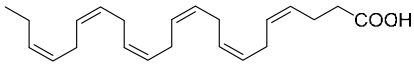
incluso consumidas en pequeñas cantidades.[16] Se asocian a aumento de colesterol LDL, inflamaciones coronarias, riesgo de ataque cardiaco o diabetes; si bien hay discrepancias que apuntan a que la grasa *trans* proveniente de rumiantes no sería tan perniciosa. En concreto, un tipo de grasa con origen en rumiantes y de especial interés es el ácido linoleico conjugado (CLA) que consiste en una familia de isómeros del ácido linoleico donde alguno de los dobles enlaces ha sido traspuesto a posiciones conjugadas. En la trasposición, estos dobles enlaces pueden adoptar una disposición *trans*. El isómero más frecuente de CLA es el 9-*cis*, 11-*trans* y es conocido como ácido ruménico en alusión a su origen. Pese a su disparidad (se trata de una grasa conjugada y *trans*), ha demostrado efectos beneficiosos para la salud.[17]

En los embutidos objeto de nuestro estudio no se utilizan carnes de rumiantes sino carnes grasas de origen porcino, por lo que la presencia de grasa *trans* en el producto final se deberá a transformaciones posteriores y no a la materia prima.

La composición de la grasa en los cerdos es variada y depende de diversos factores.[3] Los cerdos son capaces de transformar los nutrientes de la dieta como carbohidratos o proteínas en grasas a través de lo que se conoce como síntesis *de novo*.[18] La grasa así creada es, principalmente, saturada y monoinsaturada (palmítico, esteárico, oleico, …). Por otro lado, los cerdos son monogástricos y por lo tanto incorporan a sus tejidos adiposos los ácidos grasos de la ingesta.[19] En dietas basadas en cereales y forrajes una parte significativa de la grasa incorporada es poliinsaturada.

La composición de la grasa de cerdo es, generalmente, abundante en ácidos grasos saturados y monoinsaturados, y con proporciones variables de poliinsaturados. La proporción de grasa saturada/monoinsaturada/poliinsaturada ronda valores que giran en torno a la proporción 4:5:1,[20] aunque pueden variar. Que la grasa del cerdo sea más firme o no dependerá principalmente de cuánta grasa *de novo* ha sido generada frente a cuánta grasa poliinsaurada ha sido incorporada a través de la dieta.

Tabla 2.1: Ácidos grasos más comunes en alimentos.

Nombre	Estructura	Identificación	Saturación
Ácido palmítico		16:0	saturado
Ácido esteárico		18:0	saturado
Ácido mirístico		14:0	saturado
Ácido oleico		18:1 n-9	mono-insaturado
Ácido palmitoleico		16:1 n-7	mono-insaturado
Ácido elaídico		18:1 n-9 (t)	mono-insaturado
Ácido linoleico		18:2 n-6	poli-insaturado
Ácido α-linolénico		18:3 n-3	poli-insaturado
Ácido araquidónico (ARA)		20:4 n-6	poli-insaturado
Ácido eicosapentaenoico (EPA)		20:5 n-3	poli-insaturado
Ácido docosahexaenoico (DHA)		22:6 n-3	poli-insaturado

2.3 DEGRADACIÓN DE LAS GRASAS

Las grasas, en particular los triglicéridos, son sustancias muy estables, pero no inertes. El tiempo, la temperatura, la aireación y otros factores contribuyen a que la grasa se degrade y se transforme en otro tipo de sustancias. Las nuevas sustancias modifican el perfil sensorial del alimento, desencadenando lo que se conoce como rancidez. Hay dos principales vías de degradación de las grasas: la oxidación y la lipólisis.

La degradación oxidativa[13,21] es un conjunto complejo de reacciones radicalarias favorecidas por la presencia de oxígeno, sustancias pro-oxidantes, luz o enzimas. Puesto que es radicalaria, comprende etapas de iniciación, propagación y terminación. Conviene resaltar que no todos los tipos de grasa son igual de susceptibles a la oxidación. La etapa de iniciación comprende la pérdida de un hidrógeno y la formación de un radical libre. De todos los hidrógenos presentes, los de los metilenos bisalílicos (entre dos dobles enlaces) son los más propensos a formar el radical libre; de ahí que las grasas poliinsaturadas sean más fácilmente oxidables.

El radical libre puede reaccionar con el oxígeno para dar lugar a un radical peróxido. Éste puede captar un hidrógeno de otro triglicérido (desencadenando la propagación radicalaria) y estabilizarse como hidroperóxido. A su vez, el hidroperóxido, que no es demasiado estable, puede descomponerse a través de un intermedio radical alcoxi y formar dos moléculas de aldehído, o una cetona o un alcohol. También, la propagación radicalaria es responsable de reacciones que originan epóxidos.

Asimismo, a partir del radical libre en el carbono bisalílico es posible que el doble enlace adyacente se transponga para dar lugar a un sistema conjugado de dobles enlaces. Tras la transposición, el nuevo doble enlace puede ser *trans*.

En resumen, los productos de degradación más comunes son hidroperóxidos y aldehídos, y los mecanismos de degradación favorecen la formación de sistemas conjugados de doble enlaces y de aldehídos conjugados tanto *cis* como *trans*. En menor medida también se originan epóxidos, cetonas y alcoholes. En la Figura 2.4

se representa resumidamente algunas de las vías de reacción que conducen a los nuevos compuestos.

El grado de insaturación influye en la incidencia de deterioro oxidativo. Debido a que las posiciones bisalílicas son más propensas a iniciar la degradación, los ácidos grasos poliinsaturados son más sensibles a la oxidación. Comparada con una grasa saturada, la velocidad de oxidación de una monoinsaturada sería del orden de 10 veces mayor, mientras que para las grasas diinsaturadas y poliinsaturadas sería de 100 y 150 veces mayor, respectivamente.[22]

Otros factores extrínsecos que favorecen la oxidación son la exposición al O_2 (aireación, agitación, relación de superficie), la temperatura, la luz y los cationes metálicos, siendo el cobre particularmente prooxidante.

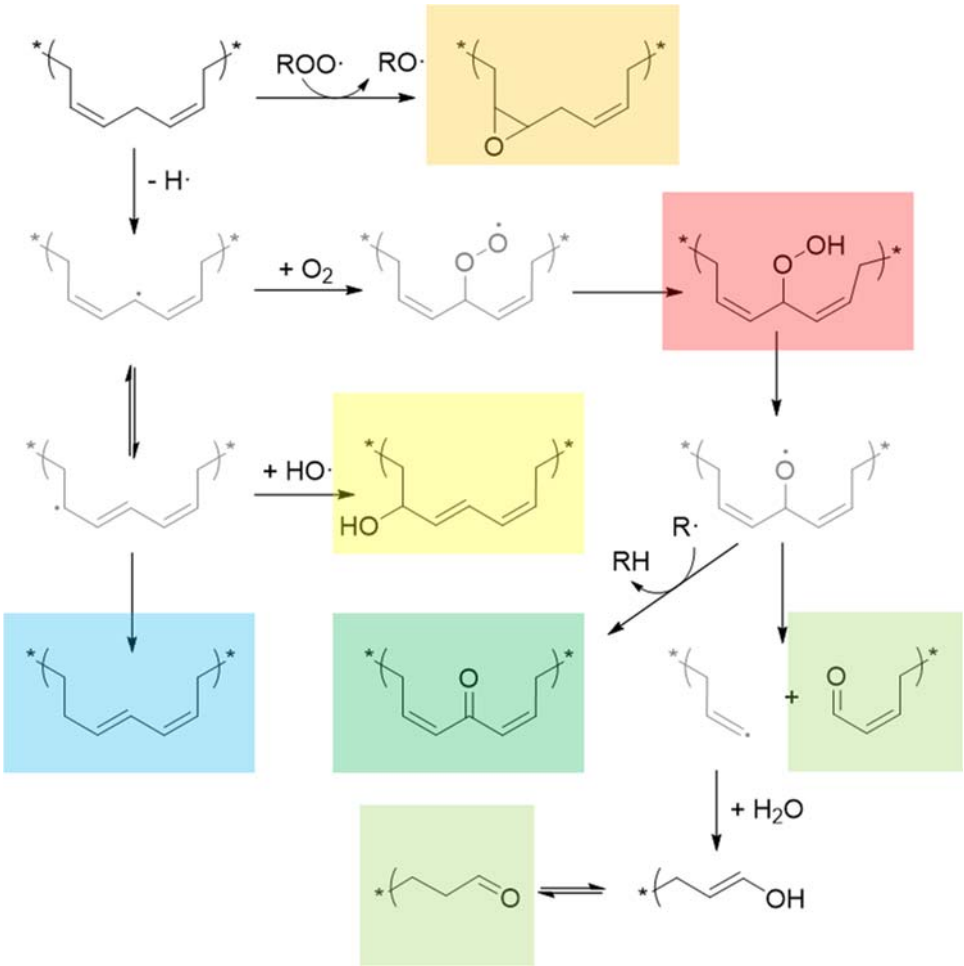


Figura 2.4: Ejemplos de vías de reacción de transposición de dobles enlaces y formación de hidroperóxidos, epóxidos, alcoholes, cetonas y aldehídos durante el deterioro oxidativo de grasas.

La otra vía de degradación de los triglicéridos es la lipólisis, que consiste en la hidrólisis del enlace éster y la liberación de los ácidos grasos libres. La hidrólisis está favorecida por la presencia de agua, la temperatura o por la presencia de enzimas lipasas.

La pérdida progresiva de los ácidos grasos transforma los triglicéridos (TAG) en diglicéridos (DAG), monoglicéridos (MAG) y finalmente en glicerol (Figura 2.5).

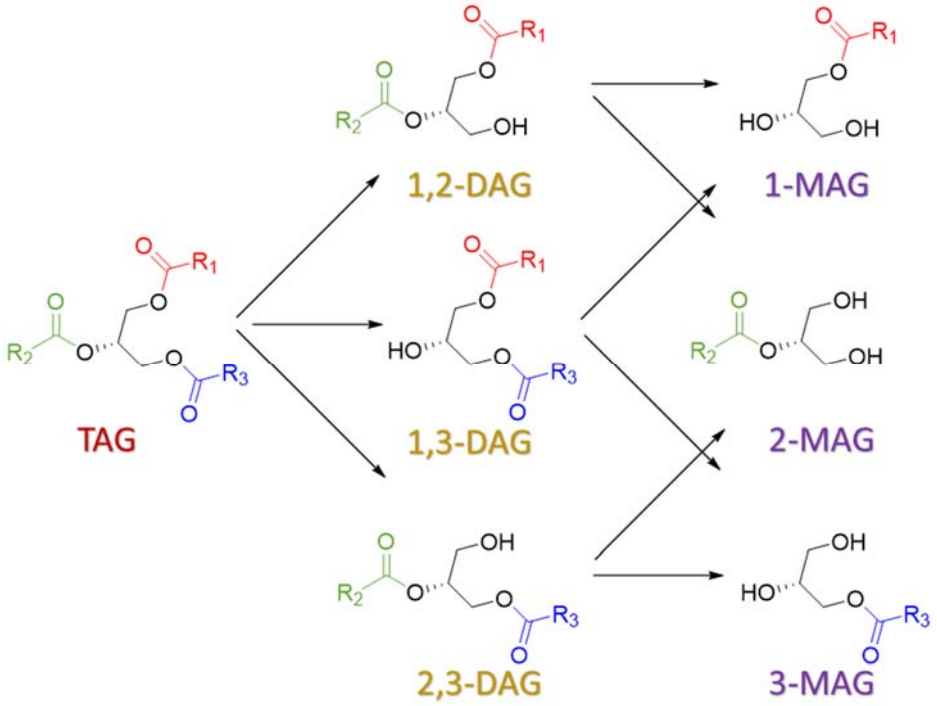


Figura 2.5: Degradación lipolítica de triglicéridos y transformación en di- y monoglicéridos.

La pérdida del resto en posición 3 genera el 1,2-DAG; la pérdida del resto en posición 2 el 1,3-DAG y así sucesivamente. A efectos prácticos, y siempre y cuando la técnica analítica no sea quiral y no sea capaz de distinguir enantiómeros los diglicéridos 1,2-DAG y 2,3-DAG son equivalentes. De manera análoga, 1-MAG y 3-MAG serían indistinguibles. Según esta peculiaridad, podemos simplificar y referirnos a 1,2-DAG cuando el ácido graso saliente provenga de cualquiera de las dos posiciones de los extremos y 1,3-DAG cuando el saliente sea el de la posición central. Respecto a los monoglicéridos, los referiremos como 1-MAG cuando una de las dos posiciones exteriores permanezca esterificada y 2-MAG cuando sea la central.

Los mono- y diglicéridos pueden isomerizar mediante una transposición que utiliza un intermedio acetal (Figura 2.6). De esa forma, los 1,2-DAG se pueden transformar

en 1,3-DAG (más estable termodinámicamente), y análogamente, los 2-MAG en 1-MAG. Para los diglicéridos se alcanzan proporciones 2:1 a favor del isómero 1,3-DAG en el equilibrio; mientras que en monoglicéridos la proporción es 9:1 a favor del 1-MAG.[23]

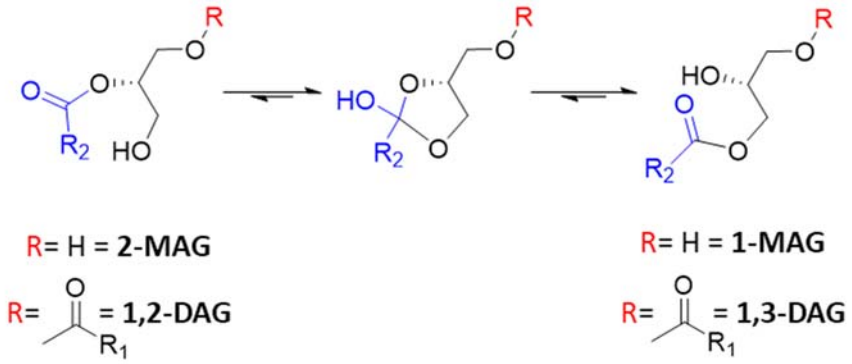


Figura 2.6: Isomerización de mono y diglicéridos mediante transposición con intermedio acetal.

El contenido en diglicéridos de un aceite de oliva y, en particular, la relación entre 1,2-DAG y 1,3-DAG son utilizados como indicadores del grado de calidad y de frescura.[24–26] Una cifra alta de diglicéridos totales, o una mayor presencia de 1,3-DAG son indicadores de periodos largos de conservación.

2.4 MÉTODOS DE ANÁLISIS DE LAS GRASAS

Desde organizaciones como la *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC), *American Oil Chemists' Society* (AOCS), *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) o el Consejo Oleícola Internacional, y también desde la legislación, tanto española como europea, se vela por la calidad y seguridad de los alimentos y, por tanto, de las grasas. Para facilitar, homogeneizar y estandarizar los análisis, estas organizaciones proponen **métodos oficiales de análisis**.

Los diferentes métodos de análisis de grasas están dirigidos a la obtención de información en diferentes aspectos como el sensorial, composicional, físico, nutricional, etc.

Los métodos de **análisis sensorial** utilizan los sentidos humanos para evaluar atributos como aspecto, aromas, sabor, textura, etc. Existen procedimientos normalizados que reducen variables y aplican estadísticos que eliminan el problema de subjetividad intrínseco a las percepciones sensoriales. En el caso del aceite de oliva, uno de los requisitos para poder ser calificado como virgen extra consiste en superar un análisis sensorial (Reglamento (CE) nº 1234/2007). El método de análisis está fijado por el Consejo Oleícola Internacional y estandariza numerosos aspectos del análisis como el vocabulario, condiciones de la cata, procedimiento, número mínimo de catadores, interpretación de los resultados, etc. (Figura 2.7).

Debido a la complejidad del análisis sensorial, se han desarrollado técnicas instrumentales como alternativa. El color puede ser medido mediante el uso de equipos colorímetros y expresado en coordenadas CIELAB. También la fracción volátil de los aceites puede ser analizada con técnicas cromatográficas[27–29] o con narices electrónicas.[30]

FICHA DE CATA DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN

Intensidad de percepción de los defectos

Atrojado/borras (*)		
Mohoso/húmedo/terroso (*)		
Avinado/avinagrado ácido/agrio (*)		
Aceitunas congeladas (madera húmeda)		
Rancio		
Otros atributos negativos:		
Descriptor:	Metálico ☐ Heno ☐ Gusano ☐ Basto ☐ Salmuera ☐ Cocido o quemado ☐ Alpechín ☐ Esparto ☐ Pepino ☐ Lubricante ☐	

(*) *Bórrese lo que proceda*

Intensidad de percepción de los atributos positivos

Frutado			
	Verde ☐	Maduro ☐	
Amargo			
Picante			
Nombre del catador:		Código catador:	
Código de la muestra:	Firma:		

Figura 2.7: Hoja de cata para análisis sensorial de aceite de oliva virgen extra AOVE.

Otros análisis están enfocados a las **propiedades físicas** de las grasas, como por ejemplo densidad, viscosidad y punto de fusión. Es frecuente el análisis de **contenido de grasas sólidas**. Este parámetro es un buen indicador de propiedades como untabilidad, firmeza, palatabilidad y estabilidad. Se define como el porcentaje de grasa que permanece sólida a una cierta temperatura aunque es frecuente medir la variación del contenido de grasas sólidas a lo largo de un rango de temperaturas. El parámetro puede calcularse a partir de medidas de densidad a varias temperaturas (la densidad de la grasa sólida es mayor) aunque recientemente han sido desarrollados procedimientos instrumentales rápidos basados en RMN de relaxometría (diferentes a la espectroscopia de RMN). La técnica se basa en que la magnetización nuclear como consecuencia de un pulso recupera el equilibrio más rápidamente para la grasa en estado sólido. Este efecto permite estimar la proporción de grasa sólida/líquida.

En el apartado de **análisis composicional**, destacan tres procedimientos clásicos, todos ellos basados en volumetrías: el índice de acidez, el índice de saponificación y el índice de yodo.

El **índice de acidez** es una medida de la cantidad de ácidos grasos libres presentes en la muestra y es, por tanto, indicador del grado de lipólisis. Consiste en una valoración ácido-base con KOH en etanol para cuantificar los ácidos carboxílicos.

El **índice de saponificación** sirve para calcular el peso molecular promedio de los triglicéridos y es indicador de la longitud de los ácidos grasos presentes. Consiste en una saponificación completa de la grasa y en una posterior valoración del exceso del KOH.

El **índice de yodo** sirve para calcular la cantidad de dobles enlaces presentes en las cadenas de los ácidos grasos, es decir, el grado de insaturación de la muestra. La grasa se hace reaccionar con yodo y posteriormente se valora el exceso sin reaccionar frente a $Na_2S_2O_3$.

Los métodos clásicos de análisis están siendo reemplazados por técnicas instrumentales modernas. En análisis composicional, la cromatografía de gases (GC) aporta información mucho más detallada, pues permite el análisis detallado del **perfil de ácidos grasos** presentes en la muestra.[31] Para el análisis

cromatográfico de ácidos grasos se lleva a cabo una etapa previa de transesterificación. Los ésteres metílicos de los ácidos grasos pueden ser separados y cuantificados mediante la técnica de CG utilizando columnas capilares y detectores de ionización de llama. Esta técnica también permite distinguir los isómeros *trans*. A partir de los datos de análisis de perfil de ácidos grasos es posible calcular el índice de saponificación y el índice de yodo.

Aparte del porcentaje global de ácidos grasos, la propia composición de los triglicéridos (los tres ácidos grasos que lo componen y en qué orden), puede afectar a propiedades como el punto de fusión o a la estructura cristalina. El análisis con cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) puede aportar información acerca de esta característica.[32]

Las técnicas cromatográficas también son útiles para el análisis de compuestos minoritarios de la fracción insaponificable como esteroles (GC) o tocoferoles (HPLC).

Otra serie de métodos de análisis se centran en la detección y cuantificación de las sustancias generadas durante la **degradación oxidativa** o durante la **lipólisis**.

Aunque la monitorización de la lipólisis puede llevarse a cabo mediante el análisis de índice de acidez, este procedimiento no aporta información acerca de cuánta proporción de triglicérido se ha transformado en diglicérido o monoglicérido. Mucho menos indica si los diglicéridos son 1,2-DAG ó 1,3-DAG o si los monoglicéridos son 1-MAG ó 2-MAG. Para poder recabar información sobre estas especies se requiere de técnicas de análisis como el HPLC de forma análoga al caso del análisis de triglicéridos. La cromatografía gaseosa también permite el análisis de DAG y MAG siempre y cuando se lleve a cabo una previa reacción de sililación para aumentar su volatilidad.[33] También se obtienen buenos resultados con la cromatografía gas-líquido de alta temperatura (HTGLC).[34]

Otro método de análisis clásico es la **determinación de compuestos polares**. Se lleva a cabo mediante gravimetría tras separación en columna de silica-gel de los triglicéridos inalterados (que son eluídos) mientras que el conjunto de productos de lipólisis (ácidos grasos libres, mono- y diglicéridos) y productos de oxidación como oxoácidos o hidroxiácidos quedan retenidos en la columna.

El estudio de la oxidación se lleva a cabo a través del análisis de los productos de la degradación. El **índice de peróxidos**[35] es un método de análisis muy conocido. Se basa en la reacción de las especies peróxido frente a KI y en una posterior valoración del I_2 generado frente a $Na_2S_2O_3$. El análisis de índice de peróxidos es útil para identificar las primeras etapas de la oxidación. Cuando la oxidación avanza el índice de peróxidos se mantiene más o menos constante y el seguimiento del avance de la reacción se lleva cabo mediante el análisis de las especies secundarias generadas, como aldehídos y cetonas. Existen varios métodos para cuantificar estas sustancias. El **análisis de TBARS**[36] (sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico) es uno de los procedimientos más antiguos con este fin. El ácido tiobarbitúrico reacciona, principalmente, con el malondialdehído que es el principal subproducto fruto de la descomposición oxidativa de los ácidos grasos poliinsaturados, aunque también reacciona inespecíficamente con otros aldehídos. El aducto formado es coloreado, y se cuantifica mediante espectrofotometría a 535 nm. Otros procedimientos similares son el **índice de *p*-anisidina** y el **índice de carbonilo**. El primero se basa en la generación de un compuesto coloreado mediante la reacción de los aldehídos y cetonas con el reactivo *p*-anisidina. La cuantificación se realiza mediante espectrofotometría a 350 nm. Para el índice de carbonilos el reactivo es la 2,4-dinitrofenilhidraZina y la hidrazona resultante se cuantifica a 420 nm.

En todos estos métodos clásicos existen, en mayor o menor medida, problemas de inespecificidad que hacen que los resultados no describan exactamente la realidad de la muestra. Como alternativa, existen procedimientos cromatográficos (GC ó HPLC), combinados con espectrometría de masas (MS) como detector, capaces de describir y cuantificar con precisión especies concretas de hidroperóxidos, epóxidos, aldehídos, cetonas, dienos, etc.[21]

Para poder prever la estabilidad de las grasas a lo largo del tiempo se llevan a cabo también, estudios de **oxidación acelerada**. En estos estudios se expone al alimento a condiciones de estrés (oxígeno y temperatura) y se monitoriza la evolución de la degradación a lo largo del ensayo. Algunos ejemplos de ensayos de oxidación acelerada son:

- **AOM** o *active oxygen method*: medida periódica del índice de peróxidos sobre la muestra de aceite sometida a calentamiento y borboteo de aire seco.
- **Rancimat**: medida de cambios en conductividad en el aire causados por los volátiles generados al calentar la muestra de grasa con borboteo de aire.
- **Schaal**: muestreo periódico de la degradación oxidativa (índice de peróxidos) en una muestra de grasa calentada en horno en recipiente abierto.
- **RapidOxy** o test de bomba de oxígeno: medida del descenso de presión de oxígeno durante el calentamiento de una muestra de grasa en recipiente cerrado.

La Figura 2.8 resume esquemáticamente las diferentes técnicas de análisis de grasas.

A efectos prácticos, los métodos clásicos de análisis composicional presentan algunas ventajas como la sencillez y accesibilidad ya que no requieren de instrumentación compleja. Sin embargo, presentan también desventajas, puesto que requieren de mucho tiempo de operador. Además, la exactitud y reproducibilidad dependen en buena parte de la experiencia del analista (determinación de virajes en valoraciones) y algunos de los métodos de análisis son bastante inespecíficos. Las alternativas a estos análisis comprenden, generalmente, técnicas cromatográficas.[37] Algunas de ellas, como el perfil de ácidos grasos, no son excesivamente complejas ni requieren de equipamiento sofisticado aunque se trata de análisis largos y que requieren de preparaciones de muestra más o menos laboriosas. Otras soluciones cromatográficas son incluso menos accesibles, puesto que requieren de instrumentos costosos (MS) o se basan en procedimientos más complejos que requieren de amplia experiencia.

Figura 2.8: Esquema resumen de los análisis de grasas más habituales.

En términos generales, tanto los métodos de análisis clásicos como los cromatográficos son procedimientos costosos en **tiempo**. Por esta razón, se ha trabajado en la búsqueda de alternativas analíticas capaces de reducir los tiempos. Las técnicas espectroscópicas pueden aportar ventajas al respecto, pues son rápidas y versátiles. Por lo general no requieren de laboriosas preparaciones de muestra y además pueden llegar a aportar información variada sobre diferentes analitos o características de la muestra en un único experimento.

Por ejemplo, el análisis por infrarrojo cercano (NIR) permite estimar con bastante precisión el grado de insaturación de la grasa.[38] El equipo NIR requiere de una larga

calibración inicial, pero luego permite análisis tan rápidos que puede ser implementado en control de calidad en línea. Aunque los resultados no son tan específicos como los obtenidos por GC, la rapidez de análisis lo compensa.

La espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) y el análisis con RAMAN también pueden aplicarse al análisis de autenticidad de aceites.[39] También puede aplicarse la FTIR en el seguimiento de la degradación térmica de aceites.[40]

Otro ejemplo de técnica espectroscópica con enorme potencial en análisis de alimentos es la espectroscopia de RMN. En el análisis de RMN la muestra se deposita en el interior de un campo magnético intenso, produciendo una orientación de los espines nucleares de los átomos que componen la sustancia a analizar. A continuación, se aplica energía en forma de radiación electromagnética para cambiar temporalmente la orientación de estos espines. Cuando la radiación se detiene, los espines se reorientan de nuevo y liberan energía durante el proceso (relajación). Examinando el espectro de la energía liberada se puede deducir información estructural y composicional de la muestra.

La RMN tiene claras ventajas. Es una técnica de alto rendimiento, capaz de detectar muchos tipos de sustancias y capaz de discriminar varios analitos a la vez. Es cualitativa, gracias a que aporta información estructural muy específica y además es cuantitativa, pues la intensidad de la señal es proporcional a la cantidad de analito. Es lineal y específica, es robusta y altamente reproducible. No es destructiva, lo que permite recuperar la muestra utilizada o, incluso, monitorizar la evolución de una misma muestra a lo largo del tiempo. Requiere de una mínima preparación de muestra y, en la mayoría de los casos, no es necesario realizar separaciones previas ni derivatizaciones. Dependiendo de la muestra, los análisis pueden ser rápidos (2-5 min) aunque lo habitual para obtener la mayor información posible son duraciones en torno a 10 min.

Pese a tantos argumentos favorables, la RMN también cuenta con algunas debilidades. Comparada con técnicas como MS no es muy sensible, siendo su límite de detección concentraciones en el rango μM. Además, en algunas matrices complejas las señales de los diferentes analitos se solapan ente sí, dificultando su identificación y cuantificación. Por último, la instrumentación requerida para el

análisis es complejo y costosa, tanto más costosa cuanto mayor sensibilidad y resolución ofrece la máquina.

Aunque nuestro estudio se centrará en la espectroscopia de RMN, existen otras técnicas analíticas basadas en el fenómeno de la resonancia magnética que también tienen su aplicación en el análisis de alimentos. La Resonancia Magnética de Imagen[41] (RMI) se basa en la aplicación de gradientes sobre una muestra sólida sometida a un campo magnético externo. Lo tiempos de relajación de las señales de protón de los diferentes tejidos son medidos a lo largo de todo el tejido bajo un campo magnético inhomogéneo, permitiendo la construcción de una imagen en la que los diferentes tejidos muestran diferentes comportamientos. Las señales de resonancia adquiridas sirven para construir una imagen espacial de la muestra, a modo de mapa de densidad de espín. La RMI es muy útil en medicina diagnóstica, aunque también ha sido aplicada al estudio de alimentos.[42]

Otra técnica de análisis basada en resonancia magnética es la RMN de dominio temporal (TD-NMR). Mide fenómenos como la relaxometría y difusometría y se aplica al análisis de contenido de grasas sólidas, distribución de tamaño de gota y contenido en grasas y humedad.[43]

A continuación, profundizaremos un poco más en la espectroscopia de RMN.

2.5 HISTORIA DE LA RMN

En 1938, I. I. Rabi lograba medir el momento magnético nuclear con precisión aplicando la medida de la absorción de resonancia magnética sobre haces moleculares. En 1946, F. Bloch y E. M. Purcell demostraron con éxito la RMN en la materia condensada, tanto en disoluciones como en sólidos. A partir de 1949 se descubrió el desplazamiento químico como las pequeñas diferencias de frecuencia de Larmor para los diferentes átomos en una molécula en función de su entorno químico. Esto sentó las bases de la aplicación de RMN en la identificación de sustancias. En 1958 se perfeccionó la RMN de sólidos mediante la aplicación del ángulo mágico (*magic angle spinning*, *MAS-NMR*). En 1964 se mejoró el análisis con

la aplicación de la transformada de Fourier. En 1974, R. Ernst llevó a cabo experimentos de RMN en dos dimensiones. Esto último unido a las mejoras tecnológicas (electroimanes de alto campo, potencia computacional) disparó el potencial de la técnica. En 1980, K. Wüthrich consiguió determinar estructuras de proteínas mediante RMN.

El transcurso del desarrollo de la técnica ha dado lugar a numerosos premios Nobel (Figura 2.9):

- 1943, O. Stern, Premio Nobel de Física
- 1944, I. I. Rabi, Premio Nobel de Física
- 1952, F. Bloch y E. M. Purcell, Premio Nobel de Física
- 1991. R. R. Ernst, Premio Nobel de Química
- 2002, K. Wüthrich, Premio Nobel de Química
- 2003, P. Mansfield y P. Lauterbur, Premio Nobel de Medicina

Figura 2.9: Investigadores premiados con el Nobel por sus trabajos sobre la Resonancia Magnética Nuclear.

2.6 FUNDAMENTOS DE LA RMN

La resonancia magnética nuclear se basa en la interacción del momento magnético de un núcleo atómico con un campo magnético externo. Los núcleos atómicos están eléctricamente cargados y están girando, por lo que se comportan como minúsculos imanes. No obstante, debido a la orientación al azar de los núcleos y a los movimientos brownianos, la magnetización global de las sustancias es nula.

Sin embargo, cuando un campo magnético externo es aplicado, los momentos magnéticos de los núcleos se orientan bajo su influencia. Todos los núcleos con número cuántico de espín distinto de cero presentan propiedades magnéticas, siendo los núcleos con número de spin ½ los más apropiados para su estudio en RMN (^{1}H, ^{13}C, ^{31}P, ^{19}F, …). Los núcleos con espín ½ pueden orientarse de forma paralela o antiparalela al campo externo. Estas dos orientaciones permitidas presentan diferente energía y, como consecuencia, la orientación de menor energía estará más poblada, creando un efecto de magnetización neta en la dirección del campo magnético externo.

En los experimentos de RMN se aplica una radiación sobre la muestra que está sometida al campo magnético externo. La radiación aplicada está en el rango de las radiofrecuencias y tiene asociado un campo magnético, que denominaremos campo magnético temporal y que es perpendicular al campo externo y tiene una frecuencia tal que es capaz de aportar la diferencia de energía entre los dos niveles energéticos permitidos: paralelo y antiparalelo. Cuando la muestra absorbe esta energía se producen transiciones entre los dos niveles y este fenómeno se conoce como resonancia magnética. Cuando cesa la radiación, el sistema perturbado vuelve a su estado normal en un proceso conocido como relajación.

El registro de la evolución de la magnetización tras el pulso de irradiación se conoce como FID (free induction decay) o atenuación libre de la inducción y es una señal en forma de curva sinusoidal amortiguada dependiente del tiempo. Esta señal puede ser tratada matemáticamente (transformada de Fourier) y convertida en un espectro de RMN, donde se representan las señales de los diferentes núcleos en función de sus frecuencias.

La razón por la que diferentes núcleos de un mismo elemento generan señales distintas (diferentes frecuencias) tiene que ver con el hecho de que el entorno químico para cada núcleo es diferente. Durante la relajación, la transferencia de energía se ve afectada por los movimientos moleculares (colisión, rotación, vibración,…). Por otro lado, los electrones que rodean al núcleo en los orbitales moleculares originan un campo magnético que modifica el efecto del campo externo ocasionando el efecto conocido como apantallamiento y que produce pequeñas variaciones en la frecuencia de resonancia. Asimismo, los núcleos vecinos también tienen spin y generan un campo magnético que puede afectar a la señal y provocar desdoblamiento de señales por acoplamiento. En definitiva, la frecuencia a la que aparecen las señales, así como su multiplicidad (acoplamiento), aportan datos sobre el entorno estructural de cada núcleo. Por esta razón, la RMN es muy útil a la hora de diferenciar los diferentes tipos de átomos presentes en una molécula en función de su posición y entorno químico; permitiendo obtener información estructural.

La variación en la frecuencia de resonancia entre núcleos del mismo tipo causada por diferencias en su distribución electrónica se conoce como desplazamiento químico (*chemical shift*) y se denota con el símbolo δ. La magnitud de este desplazamiento se calcula frente a la frecuencia de un material de referencia, generalmente una molécula con una distribución electrónica apenas distorsionada. El desplazamiento químico se expresa en partes por millón (ppm) puesto que se calcula dividiendo la diferencia de frecuencias entre señal y referencia (Hz) por la frecuencia de resonancia del núcleo en el campo externo (MHz)

Adicionalmente, las posibilidades del análisis con RMN no se limitan al plano estructural o cualitativo, sino que también es una técnica muy robusta desde el punto de vista **cuantitativo**. La intensidad de cada señal (el área) es proporcional al número de átomos que la causan. Así, por ejemplo, el protón de un grupo metino (>CH-) genera una señal con una intensidad determinada, mientras que los dos protones de un metileno (>CH_2) que son químicamente equivalentes entre sí generan una única señal cuya intensidad es el doble; y los tres protones de un metilo (-CH_3) una señal con el triple de intensidad. Esta propiedad también es muy útil a la hora de analizar mezclas, puesto que comparando intensidades de señales

de cada una de las sustancias de la mezcla se puede establecer la proporción de cada una de ellas.

2.7 EL EQUIPO DE RMN

La instrumentación de espectroscopia RMN consta de cuatro componentes principales: el imán, la sonda, la consola y el ordenador (Figura 2.10).

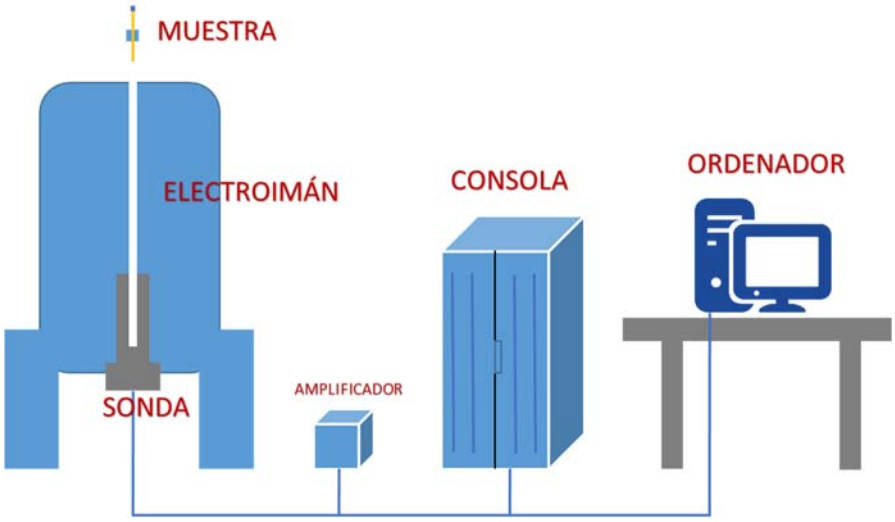


Figura 2.10: Representación de las partes de un espectroscopio de RMN.

El **imán** produce un campo magnético externo capaz de alinear los espines de los núcleos y generar una polarización neta. Cuanto mayor sea el campo magnético, mayor será la separación entre los niveles de energía y mayor será la polarización; lo que se traduce en mayor sensibilidad. También mejora la resolución de las señales ya que a mayores campos se logran señales más estrechas y se minimizan los solapamientos.

El imán puede ser un imán permanente o un electroimán, aunque para lograr campos más intensos (de 7 a 23 Teslas, tres órdenes de magnitud por encima del

campo magnético terrestre) se recurre a electroimanes superconductores. Para mantener las propiedades superconductoras se necesitan temperaturas muy bajas (-269° C) y por ello el electroimán está recubierto con un recipiente aislante con doble camisa, donde la camisa interna está rellena con He líquido y la externa con N_2 líquido.

La técnica recurre a campos magnéticos muy intensos para lograr mejorar la sensibilidad y la resolución de señales. La relación señal/ruido es proporcional a la fuerza del campo magnético elevada a 7/4.[44] Por ejemplo, la sensibilidad de un equipo de 400 MHz (9.4 T) es 3 veces inferior a la de un equipo de 800 MHz (18.8 T) y en materia de resolución, las señales son el doble de anchas en el equipo de 400 MHz (lo que repercute en mayor probabilidad de solapamientos).

En el interior del imán se sitúa la **sonda**, que rodea el tubo de muestra. La sonda incluye la bobina responsable de acoplar sobre la muestra la radiofrecuencia generada por el transmisor durante el pulso de excitación (cambiando la orientación de la magnetización). Posteriormente, mediante mecanismos de inducción, detecta la señal de resonancia tras la relajación y la envía al receptor de radiofrecuencias para su amplificación y digitalización.

La criosonda es una tecnología que permite enfriar a 20 K la bobina de la sonda logrando incrementar la sensibilidad hasta 4 veces.[45]

En la **consola** se agrupa la mayor parte de los sistemas electrónicos del instrumento. Controla el sistema emisor/receptor de radiofrecuencias, el sistema de bloqueo de frecuencia, los gradientes, el giro de muestra y la temperatura.

El último componente del instrumento es el **ordenador**. El ordenador ejerce de interfaz entre el usuario y el sistema y se conecta con la consola para controlar todos los procesos y lanzar las instrucciones necesarias para el análisis. Recibe los datos digitalizados y los transforma en espectros interpretables.

El equipo utilizado durante la realización de este estudio es un **Bruker Avance II 400 MHz**

Se trata de un espectrofotómetro de RMN para muestras líquidas. Dispone de sondas de banda ancha y determinación directa de diferentes núcleos (BBO, *broadband observe*), así como de determinación indirecta (BBI, *broadband inverse*), optimizada para el núcleo protón (^{1}H). Ambas sondas preparadas para tubos de 5 mm.

Consta de un solenoide superconductor de 9,4 Tesla operando a una frecuencia nominal para protón de 400 MHz.

2.8 APLICACIONES DE RMN EN ANÁLISIS DE ALIMENTOS

La RMN es una técnica analítica caracterizada por su potencial a la hora de aportar información estructural. Por ese motivo, desde el principio estuvo muy orientada a la caracterización de sustancias puras y a la elucidación de estructuras moleculares.

Sin embargo, una interesante propiedad de la RMN radica en que la intensidad de las señales es proporcional al número de átomos presentes; es decir, la RMN no es sólo **cualitativa,** sino que también es **cuantitativa**. Una herramienta que conjuga ambas capacidades es un punto de partida muy interesante para su aplicación en el análisis de mezclas. De la comparación de las señales de cada componente pueden deducirse sus proporciones en la mezcla. La única restricción es que al menos una de las señales de cada compuesto pueda identificarse de forma aislada, sin solapar.

Los alimentos son mezclas complejas de muy diversas sustancias, algunas de las cuales están presentes en grandes o pequeñas proporciones. La aplicación de la espectroscopia de RMN al análisis de alimentos fue muy temprana y ya en 1962 algunos pioneros de la técnica se aventuraban a analizar, exitosamente, el grado de insaturación y el peso molecular promedio de las grasas.[46] La progresiva implementación de avances tecnológicos ha permitido mejorar la sensibilidad y resolución de los equipos desde entonces y, en consonancia, el número de aplicaciones de la técnica en disciplinas como medio ambiente, nuevos materiales, bioquímica, farmacología y, por supuesto, alimentos.

Aunque nuestro interés se centrará en la espectroscopia de RMN de alta resolución, es decir, con equipos de 7 T o más; otras técnicas basadas en la resonancia tienen también cabida en el análisis de alimentos. Equipos de bajo campo diseñados para experimentos de difusión y de relaxometría son muy útiles en control de calidad industrial para medidas de contenido de grasa y humedad o de porcentaje de grasas sólidas. Por otro lado, la resonancia magnética de imagen (RMI) está siendo aplicada progresivamente en ensayos para la visualización no invasiva y no destructiva de alimentos como frutas, hortalizas, carnes o pescados. Existe también una técnica de análisis isotópico basada en RMN que es la SNIF-NMR (*Site-Specific Natural Isotope Fractionation by NMR*) capaz de garantizar la autenticidad o el origen midiendo la relación isotópica $^{13}C/^{12}C$ ó $^{2}H/^{1}H$.

Muchos son los núcleos atómicos que pueden ser detectados por RMN. Sin embargo, no todos ellos están presentes en los alimentos. El hidrógeno es un átomo muy abundante en los alimentos y por ello la mayoría de estudios en alimentos se basan en ^{1}H-RMN. Como desventaja, muchas de las señales pueden solaparse entre sí, dificultando el análisis. Otro de los átomos más abundantes es el carbono, aunque el isótopo que presenta propiedades magnéticas es minoritario. Aproximadamente, sólo el 1,1% de los átomos de carbono son ^{13}C, lo que repercute enormemente en la sensibilidad del experimento y se traduce en tiempos largos de adquisición. Sin embargo, como ventaja, los problemas de solapamientos son muy infrecuentes debido a la gran dispersión de las señales. Con los átomos de nitrógeno y de oxígeno la abundancia de los isótopos apropiados es muy pequeña, dificultando su aplicabilidad. Por último, aunque muy pocas moléculas presentes en los alimentos presentan fósforo, los estudios de ^{31}P-RMN han demostrado ser muy útiles para identificarlos selectivamente.[47] También se utiliza ^{31}P-RMN para resolver mezclas complejas gracias a uso de reactivos de derivatización que incluyen fósforo.[48]

La RMN aplicada a alimentos entra dentro de la disciplina conocida como **metabolómica**, que se centra en el análisis de los metabolitos presentes en sistemas biológicos. Los alimentos provienen de sistemas biológicos (vegetales o animales) y los metabolitos que se producen en las diversas reacciones bioquímicas conforman los nutrientes. Los alimentos son mezclas complejas de metabolitos, los cuales aparecen en un amplio rango de concentraciones. En alimentos elaborados,

muchos de los metabolitos provienen de la materia prima de partida; aunque algunos otros se forman durante la transformación, procesado o conservación. Asimismo, algunos metabolitos podrían ser incorporados al alimento intencionadamente, con fines de conservación o de mejora nutricional.

El análisis metabolómico puede ser abordado de dos maneras diferentes. El análisis dirigido (*targeted*) se centra en la identificación y cuantificación de ciertos metabolitos previamente seleccionados por su interés o relevancia y cuyas señales estén libres de solapamientos. Tanto la preparación de la muestra como la ejecución del análisis se adapta al fin concreto del estudio. En ocasiones, es necesaria una purificación previa o, al menos, una extracción selectiva. El análisis no dirigido (*untargeted*) tiene un enfoque más global y generalista. Sin recurrir a la identificación y cuantificación de todas las señales, compara la evolución (o no) de las diferentes zonas del espectro. El análisis de la huella metabolómica (*metabolomic figerprinting*) compara espectros de forma global. Se fundamenta en el análisis multivariante de un conjunto de datos a partir de espectros donde cada espectro puede considerarse como una huella dactilar de señales sin asignar. Los análisis metabolómicos pueden ser usados con fines informativos discriminativos, y predictivos.[49]

La RMN de alta resolución puede aplicarse a muestras sólidas o a muestras en disolución. En las muestras sólidas, la limitación de movimiento molecular dificulta el promediado de interacciones magnéticas y causa ensanchamiento de línea. Este contratiempo puede ser contrarrestado con estrategias como el giro de ángulo mágico (MAS-NMR, *magic angle spinning nuclear magnetic resonance*). La medida de los tiempos de relajación de los diferentes componentes con diferente movilidad aporta información complementaria acerca de la composición de los tejidos. La RMN de estado sólido ha sido utilizada para caracterizar las diferentes fracciones del alimento (carbohidratos, grasas, proteínas). Hoy en día, con equipos modernos, es posible incluso la identificación de componentes minoritarios de bajo peso molecular.

En nuestro trabajo nos centramos en la RMN de alta resolución para muestras en disolución. Algunos alimentos como los aceites, zumos o bebidas son líquidos homogéneos y, por tanto, pueden ser analizados directamente tras ser disueltos en

disolventes deuterados como $CDCl_3$ o D_2O. En ocasiones se requieren de ciertos tratamientos previos, como degasificación o ajuste de pH. También la liofilización o la concentración de las muestras puede ser útil.

Sin embargo, muchos de los alimentos son sólidos heterogéneos formados por componentes tanto lipófilos como hidrófilos. En estos casos se llevan a cabo extracciones previas donde el procedimiento de extracción puede ser directo o indirecto. En el primer caso, una pequeña parte del homogeneizado de la muestra es extraído directamente con el disolvente deuterado. Tras centrifugación o fliltración, la disolución puede ser analizada. En las extracciones indirectas se utilizan disolventes no deuterados para tratar la muestra. Estos disolventes deben ser retirados por destilación o vacío antes de redisolver el extracto con el disolvente deuterado. En función del tipo de sustancias a extraer, se eligen disolventes o combinaciones de disolventes de diferente polaridad.[50]

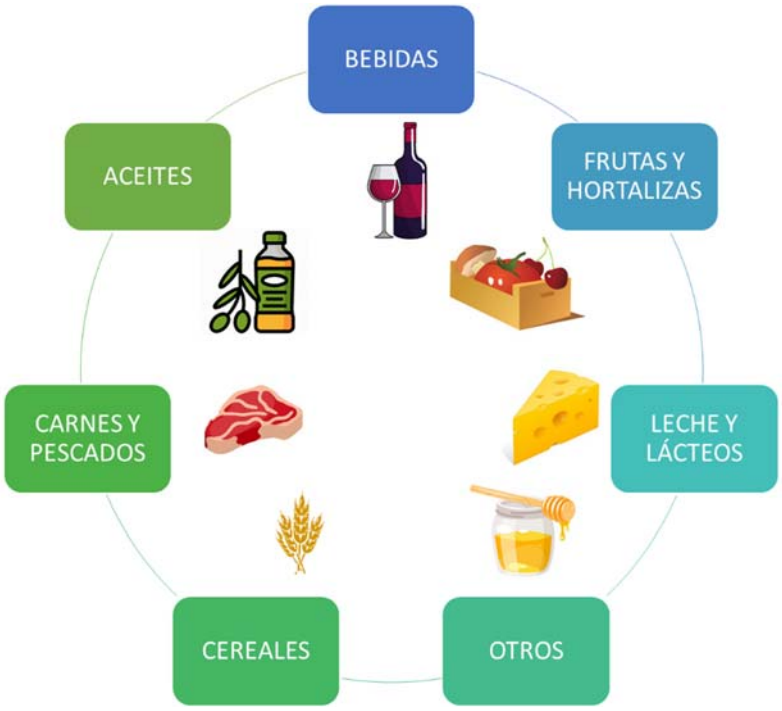


Figura 2.11: Matrices alimentarias analizadas por RMN.

El análisis de RMN ha sido aplicado al estudio de diferentes tipos de alimentos (Figura 2.11). El rango de aplicación es muy amplio e incluye bebidas (vino, cerveza, té, café, zumos), frutas, hortalizas, cereales, miel, leche y lácteos, aceites, carnes y pescados, etc. Para los diferentes alimentos, la RMN permite realizar análisis composicional y cuantificar las diferentes sustancias que tienen relevancia a nivel nutricional o como indicadores de calidad. También puede utilizarse para la detección y cuantificación de las sustancias producidas a causa de fenómenos de degradación, alteración u oxidación. El potencial de la RMN permite diferenciar alimentos que han sido sometido a diferentes condiciones de procesado o conservación. También sirve para evaluar si el alimento ha sufrido adulteraciones o mezclas con producto de menor calidad. Finalmente, los análisis de huella metabolómica son una importante herramienta para discriminar origen geográfico o variedad (Figura 2.12). [50–52]

Nuestro equipo de investigación cuenta con experiencia previa en trabajos de aplicación de la técnica de RMN al estudio del vino. Los estudios estuvieron enmarcados en el desarrollo de la tesis doctoral titulada: "*La Resonancia Magnética Nuclear como herramienta en el estudio y control del proceso de vinificación*"; defendida en 2012 por Eva López Rituerto. Los resultados del trabajo fueron exitosos y dieron lugar a varias publicaciones.[53–56]

Teniendo en cuenta esta experiencia y dados los escasos estudios realizados sobre embutidos, el presente estudio se centrará en el análisis de la fracción lipídica de los embutidos. A continuación, repasaremos los antecedentes en la utilización de la RMN para el análisis de grasas y aceites.

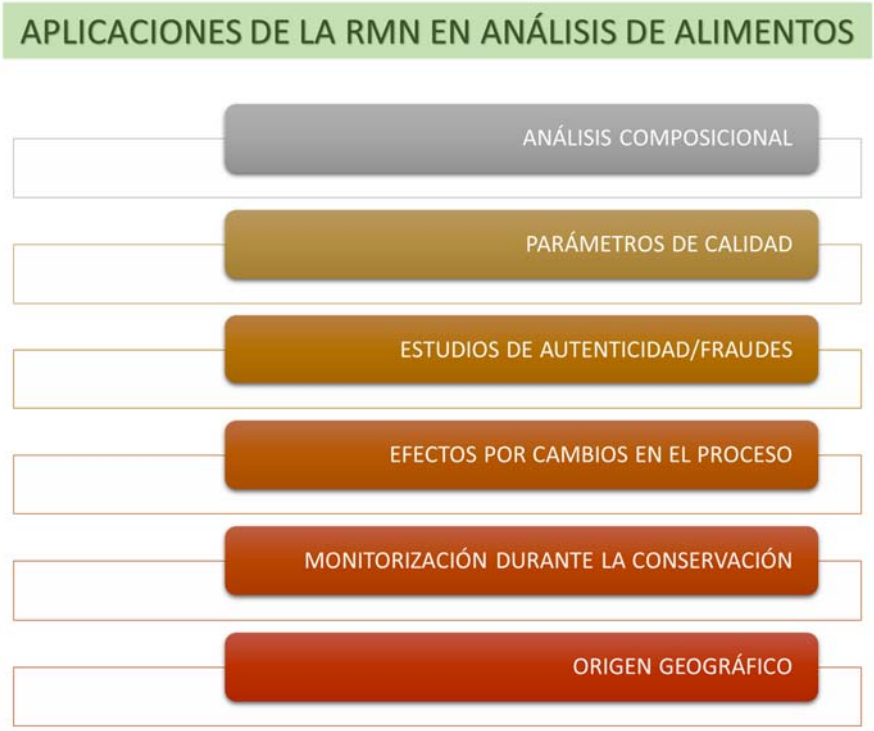


Figura 2.12: Aplicaciones de la RMN en análisis de alimentos.

2.9 ANÁLISIS DE GRASAS CON RMN

En el análisis de aceites y grasas con RMN, la preparación de la muestra es muy sencilla y se limita a disolver una pequeña cantidad en el disolvente deuterado, habitualmente $CDCl_3$. Los tiempos de análisis pueden ser muy cortos (minutos). La espectroscopia de RMN hace muy accesible el análisis del perfil de ácidos grasos. En ^{1}H-RMN, la intensidad relativa de las señales en el espectro permite calcular fácilmente las proporciones saturado/insaturado. Combinando las señales apropiadas se puede llegar a detallar los porcentajes de monoinsaturados, diinsaturados (linoleico) o triinsaturados (linolénico).[57] En el caso de grasas provenientes de pescado, los porcentajes de grasas omega 3 y en particular, de ácido docosahexaenoico (DHA) también pueden ser calculados.[58]

También es posible analizar componentes minoritarios, como por ejemplo los subproductos de la lipólisis como diglicéridos (DAG) o monoglicéridos (MAG).[59] Sin embargo, algunas de las señales de estos compuestos aparecen completa o parcialmente solapadas con señales mayoritarias que dificultan su integración. Usando equipos potentes, con frecuencias por encima de los 500 MHz, los problemas de solapamiento se solucionan. Para los equipos menos potentes, se requiere de estrategias alternativas como, por ejemplo, la derivatización con un reactivo fosforilado y el análisis de ^{31}P-RMN.[48]

Existen muchos otros componentes minoritarios que pueden ser analizados por ^{1}H-RMN como, por ejemplo, escualeno, colesterol, β-sitosterol, terpenos, ácido linolénico conjugado, etc. El análisis de los compuestos minoritarios puede aportar información relevante en términos de calidad[60] o de autenticidad del aceite[61] o incluso de origen geográfico.[62]

Asimismo, muchos subproductos de degradación oxidativa como aldehídos, cetonas, hidroperóxidos o dobles enlaces conjugados pueden ser identificados, permitiendo así el seguimiento y monitorización del proceso degradativo.[63,64] Las grasas *trans* pueden ser discriminadas con equipos de altas prestaciones o recurriendo a reactivos de desplazamiento.[65]

A partir de las señales del espectro de ^{1}H-RMN también puede calcularse el grado de acidez, aunque con mayor dificultad ya que la señal de los protones carboxílicos es muy difusa. Añadiendo DMSO a la muestra se logran minimizar los fenómenos de intercambio y la señal se vuelve fácilmente integrable.[66] Otra aproximación para calcular el grado de acidez se basa en las señales producidas por los protones unidos al carbono contiguo al carbonilo (carbono α), cuyo desplazamiento químico es ligeramente diferente en función de si el ácido graso está libre o esterificado. El solapamiento entre las dos señales es grande, aunque permite una estimación.[67]

Para calcular el grado de acidez es muy útil la ^{13}C-RMN. Las señales de los carbonilos permiten diferenciar entre ácidos grasos libres y esterificados de forma sencilla y directa. Presenta la ventaja de eliminar los problemas de solapamientos y facilita enormemente la detección de los DAG y MAG. El principal inconveniente es la duración de los análisis (horas) que limita su potencial aplicación al análisis de

rutina. Los experimentos de ^{13}C-RMN permiten también el estudio de las posiciones de los diferentes ácidos grasos en los triglicéridos.[68] La detección de adulteración de aceites de oliva con aceites esterificados (no permitidos en la UE para consumo humano) se lleva acabo analizando el porcentaje de restos saturados en posición *sn*-2 de TAG. Este análisis es relativamente sencillo y accesible con ^{13}C-RMN, frente a otras alternativas que incluyen engorrosos tratamientos enzimáticos.

^{31}P-RMN es útil en el análisis de los fosfolípidos. Además, como hemos comentado anteriormente, en muestras derivatizadas aporta información sobre DAG, MAG y también sobre ácidos grasos libres y algunos otros alcoholes presentes en la muestra.[47]

Por último, el tratamiento estadístico de los datos espectrales de RMN permite certificar el origen geográfico para los aceites, tanto con análisis de perfil metabolómico[69] como con análisis de huella dactilar.[70]

2.10 ANÁLISIS DE CARNES Y EMBUTIDOS CON RMN

En lo referente a análisis de carnes, las aplicaciones de la RMN de campo bajo son las principales protagonistas. En 1974 ya fue propuesto un procedimiento de análisis de grasas.[71] Experimentos de relajación con RMN pulsado permiten análisis de contenido en grasa que correlacionan muy bien con técnicas clásicas de análisis como Soxhlet o Folch. Empresas como Bruker o CEM comercializan equipos de RMN dedicados para análisis de grasa y humedad en alimentos. Los pequeños equipos de RMN de sobremesa pueden ser útiles es estudios más complejos, como por ejemplo en la discriminación de carnes bovinas y equinas[72] o en el estudio del efecto del tipo de grasa sobre la movilidad del agua y la distribución de la grasa en embutidos.[73]

Asimismo, la RMN de imagen ha demostrado su utilidad en el análisis de los tejidos musculares.[74]

En cuanto a las aplicaciones de la espectroscopia de RMN de alta resolución en carnes, pueden encontrarse trabajos ya en 1986 donde se estudia la evolución del

metaboloma *post mortem* en carne bovina.[75] Los primeros estudios metabolómicos en carne se centraron principalmente en la fracción hidrosoluble de las muestras cárnicas y analizaban ácido láctico, fosfocreatina, creatina, algunos aminoácidos libres o compuestos fosforilados como el ATP y sus derivados ADP y AMP.[76,77] Estudios posteriores se han centrado en el análisis de metabolitos en los exudados de las carnes para evaluar el grado de madurez de la carne y su estado de conservación.[78] Otros trabajos han comparado técnicas cromatográficas y RMN en el estudio de la evolución de la carne bovina durante su maduración mostrando buena correlación.[79]

La aplicación de la RMN para sólidos (HRMAS) directamente sobre tejido muscular ha sido también ampliamente utilizada en estudios de autenticación de origen geográfico[80] o de autenticación de raza.[81] Recientemente, también ha sido aplicada en el análisis de la evolución de los metabolitos durante la fermentación y maduración de embutidos.[82]

Las aplicaciones sobre carnes y productos cárnicos de la espectroscopia de RMN de alta resolución se centran casi siempre en la fracción hidrosoluble;[83,84] a excepción de los estudios con HRMAS donde se analizan a la vez los metabolitos hidrosolubles y liposolubles.[82]

Respecto a los escasos trabajos enfocados en el análisis de la fracción liposoluble, se encuentra un estudio donde se detalla una metodología de análisis para el CLA (ácido linolénico conjugado) presente en la carne bovina. [85] Otro estudio se centra en la detección de ciertos metabolitos (2-alquilciclobutanonas) en los extractos lipídicos de carne bovina, para determinar el efecto del tratamiento por irradiación.[86]

Tan sólo se ha encontrado un ejemplo de aplicación de la RMN al estudio de la fracción liposoluble de embutidos, y su alcance se limita al cálculo de las proporciones de los diferentes tipos de ácidos grasos.[87]

Quizás, el precedente más completo y más en línea con los objetivos de nuestro estudio se encuentre en el trabajo de Martínez-Yusta[88], donde se analizan, entre otros alimentos, la fracción lipídica del tejido adiposo porcino. En este estudio se lleva a cabo un seguimiento de la evolución del perfil de ácidos grasos en muestras

sometidas a un tratamiento termo-oxidativo, así como el estudio de los metabolitos característicos de la degradación.

2.11 OBJETIVOS

El presente estudio persigue la aplicación del potencial de la técnica de RMN al análisis de los embutidos curados, en particular, su fracción grasa.

El enfoque se centra, sobre todo, en proporcionar una potente herramienta de control que simplifique la monitorización de todo el proceso de transformación y aporte información relevante de forma sencilla, rápida y eficiente.

Ventajas como la simplificación de preparación de muestra, la rapidez del análisis, la capacidad de extraer información cualitativa y cuantitativa a la vez, la posibilidad de analizar macro y microcomponentes al mismo tiempo, etc., aportan mucho valor añadido. Sin embargo, conviene no olvidar que la técnica también presenta algunas debilidades. La RMN no es excesivamente sensible en comparación con otras técnicas y el problema de los solapamientos de señales es muy importante en mezclas complejas donde conviven muchos tipos de compuestos.

Tanto el problema de sensibilidad como el de solapamientos mejoran sensiblemente al utilizar equipos de RMN con mayores campos magnéticos (>600 MHz), pero nuestro estudio se centra en la optimización y aprovechamiento de equipos de RMN de campo medio (400 MHz) por tratarse de los más frecuentes en centros de investigación y por presentar una relación coste/prestaciones muy apropiada.

Con este fin, se explorará el potencial de la técnica para lograr la cuantificación de la relación de grasas saturadas, monoinsaturadas y poliinsaturadas presente en la fracción grasa. También se investigará la capacidad de detección y cuantificación de metabolitos vinculados a fenómenos de lipólisis, como diglicéridos y monoglicéridos, o de metabolitos vinculados a transformaciones oxidativas. Se validará la técnica analítica y se comparará frente a técnicas clásicas como acidez libre o índice de yodo. Finalmente, se probará la utilidad del método aplicándolo al análisis y monitorización del proceso de elaboración de embutido curado, desde el control de materias primas hasta la fase de conservación. También se chequeará el

potencial de la técnica tratando de medir el efecto de la aplicación de ciertos cambios de formulación o materias primas a lo largo de todo el ciclo.

La nueva metodología de análisis deberá estar adaptada a los requerimientos de la industria de elaboración de embutidos y por ello se hará especial hincapié en tratar de evitar etapas adicionales como derivatizaciones, pretratamientos de muestra o procedimientos de análisis largos.

Los objetivos científicos del trabajo quedan resumidos de la siguiente forma:

Optimización de la técnica de RMN para su uso en análisis de embutidos curados

- Selección y optimización del método de extracción de la fracción lipídica
- Selección y optimización de parámetros de análisis RMN
- Ajustes de procesado e interpretación de espectros

Aplicación de la técnica al estudio de la fracción grasa de embutidos

- Cuantificación de la relación de grasas saturadas, monoinsaturadas y poliinsaturadas
- Detección y cuantificación de metabolitos vinculados a fenómenos de lipólisis y oxidación

Validación de la técnica

- Repetibilidad y robustez
- Comparación de los resultados frente a técnicas clásicas como acidez libre, índice de yodo

Aplicación de la técnica en la monitorización y seguimiento del proceso de elaboración (y posterior conservación) de embutido curado

- Control de materias primas y análisis a lo largo del proceso de elaboración y conservación
- Medida del efecto de la aplicación de una innovación de producto a lo largo del proceso

2.12 BIBLIOGRAFÍA

(1) Parunović, N.; Radović, Č.; Savić, R. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science Sensory Properties and Fatty Acids Profiles of Fermented Dry Sausages Made of Pork Meat from Various Breeds Sensory Properties and Fatty Acids Profiles of Fermented Dry Sausages Made of Pork Meat from Various Breeds. *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* **2017**, *85*, 12014.

(2) Wood, J. D.; Enser, M.; Fisher, A. V.; Nute, G. R.; Sheard, P. R.; Richardson, R. I.; Hughes, S. I.; Whittington, F. M. Fat Deposition, Fatty Acid Composition and Meat Quality: A Review. *Meat Sci.* **2008**, *78* (4), 343–358.

(3) Hugo, A.; Roodt, E. Significance of Porcine Fat Quality in Meat Technology: A Review. *Food Rev. Int.* **2007**, *23* (2), 175–198.

(4) Testroet, E. D.; Yoder, C. L.; Testroet, A.; Reynolds, C.; O'Neil, M. R.; Lei, S. M.; Beitz, D. C.; Baas, T. J. Iodine Values of Adipose Tissue Varied among Breeds of Pigs and Were Correlated with Pork Quality. *Adipocyte* **2017**, *6* (4), 284–292.

(5) Rosenvold, K.; Andersen, H. J. Factors of Significance for Pork Quality—a Review. *Meat Sci.* **2003**, *64* (3), 219–237.

(6) Čandek-Potokar, M.; Žlender, B.; Lefaucheur, L.; Bonneau, M. Effects of Age and/or Weight at Slaughter on Longissimus Dorsi Muscle: Biochemical Traits and Sensory Quality in Pigs. *Meat Sci.* **1998**, *48* (3–4), 287–300.

(7) Beattie, V. E.; Weatherup, R. N.; Moss, B. W.; Walker, N. The Effect of Increasing Carcass Weight of Finishing Boars and Gilts on Joint Composition and Meat Quality. *Meat Sci.* **1999**, *52* (2), 205–211.

(8) Nürnberg, K.; Wegner, J.; Ender, K. Factors Influencing Fat Composition in Muscle and Adipose Tissue of Farm Animals. *Livest. Prod. Sci.* **1998**, *56* (2), 145–156.

(9) Lebret, B.; Massabie, P.; Granier, R.; Juin, H.; Mourot, J.; Chevillon, P.

Influence of Outdoor Rearing and Indoor Temperature on Growth Performance, Carcass, Adipose Tissue and Muscle Traits in Pigs, and on the Technological and Eating Quality of Dry-Cured Hams. *Meat Sci.* **2002**, *62* (4), 447–455.

(10) Hazen, T. E.; Mangold, D. W. Functional and Basic Requirement of Swine Housing. *Agri. Engin.* **1960**, *41*, 585–590.

(11) Gandemer, G. Lipids in Muscles and Adipose Tissues, Changes during Processing and Sensory Properties of Meat Products. *Meat Sci.* **2002**, *62* (3), 309–321.

(12) Severini, C.; De Pilli, T.; Baiano, A. Partial Substitution of Pork Backfat with Extra-Virgin Olive Oil in 'Salami' Products: Effects on Chemical, Physical and Sensorial Quality. *Meat Sci.* **2003**, *64* (3), 323–331.

(13) Kanner, J. Oxidative Processes in Meat and Meat Products: Quality Implications. *Meat Sci.* **1994**, *36* (1–2), 169–189.

(14) Fahy, E.; Subramaniam, S.; Brown, H. A.; Glass, C. K.; Merrill, A. H.; Murphy, R. C.; Raetz, C. R. H.; Russell, D. W.; Seyama, Y.; Shaw, W.; et al. A Comprehensive Classification System for Lipids. *J. Lipid Res.* **2005**, *46* (5), 839–861.

(15) Ratnayake, W. M. N.; Galli, C. Fat and Fatty Acid Terminology, Methods of Analysis and Fat Digestion and Metabolism: A Background Review Paper. *Ann. Nutr. Metab.* **2009**.

(16) Lichtenstein, A. H.; Appel, L. J.; Brands, M.; Carnethon, M.; Daniels, S.; Franch, H. A.; Franklin, B.; Kris-Etherton, P.; Harris, W. S.; Howard, B.; et al. Diet and Lifestyle Recommendations Revision 2006. *Circulation* **2006**, *114* (1), 82–96.

(17) Tricon, S.; Burdge, G. C.; Williams, C. M.; Calder, P. C.; Yaqoob, P. The Effects of Conjugated Linoleic Acid on Human Health-Related Outcomes. *Proc. Nutr. Soc.* **2005**, *64* (02), 171–182.

(18) Kloareg, M.; Noblet, J.; van Milgen, J. Deposition of Dietary Fatty Acids, de Novo Synthesis and Anatomical Partitioning of Fatty Acids in Finishing Pigs. *Br. J. Nutr.* **2007**, *97* (01), 35.

(19) Koch, D. E.; Pearson, A. M.; Magee, W. T.; Hoefer, J. A.; Schweigert, B. S.

Effect of Diet on the Fatty Acid Composition of Pork Fat. *J. Anim. Sci.* **1968**, *27* (2), 360.

(20) Kasprzyk, A.; Tyra, M.; Babicz, M. Fatty Acid Profile of Pork from a Local and a Commercial Breed. *Arch. Anim. Breed* **2015**, *58*, 379–385.

(21) Xia, W.; Budge, S. M. Techniques for the Analysis of Minor Lipid Oxidation Products Derived from Triacylglycerols: Epoxides, Alcohols, and Ketones. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2017**, *16* (4), 735–758.

(22) Talbot, G. The Stability and Shelf Life of Fats and Oils. In *Food and Beverage Stability and Shelf Life*; Woodhead Publishing, 2011; pp 683–715.

(23) Mattson, F. H.; Volpenhein, R. A. Synthesis and Properties of Glycerides. *J. Lipid Res.* **1962**, *3* (3), 281–296.

(24) Pérez-Camino, M. C.; Moreda, W.; Cert, A. Effects of Olive Fruit Quality and Oil Storage Practices on the Diacylglycerol Content of Virgin Olive Oils. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49* (2), 699–704.

(25) Fronimaki, P.; Spyros, A.; Christophoridou, S.; Dais, P. Determination of the Diglyceride Content in Greek Virgin Olive Oils and Some Commercial Olive Oils by Employing 31P NMR Spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50* (8), 2207–2213.

(26) Caponio, F.; Paradiso, V. M.; Bilancia, M. T.; Summo, C.; Pasqualone, A.; Gomes, T. Diacylglycerol Isomers in Extra Virgin Olive Oil: Effect of Different Storage Conditions. *Food Chem.* **2013**, *140* (4), 772–776.

(27) Snyder, J. M.; Frankel, E. N.; Selke, E. Capillary Gas Chromatographic Analyses of Headspace Volatiles from Vegetable Oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1985**, *62* (12), 1675.

(28) Lee, I.; Fatemi, S. H.; Hammond, E. G.; White, P. J. Quantitation of Flavor Volatiles in Oxidized Soybean Oil by Dynamic Headspace Analysis. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1995**, *72* (5), 539–546.

(29) Dupuy, H. P.; Flick, G. J.; Bailey, M. E.; St. Angelo, A. J.; Legendre, M. G.; Sumrell, G. Direct Sampling Capillary Gas Chromatography of Volatiles in Vegetable Oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1985**, *62* (12), 1690–1693.

(30) Dymerski, T. M.; Chmiel, T. M.; Wardencki, W. Invited Review Article: An

Odor-Sensing System—Powerful Technique for Foodstuff Studies. *Rev. Sci. Instrum.* **2011**, *82* (11), 111101.

(31) García-Olmo, J.; De Pedro, E.; Garrido, A.; Paredes, A.; Sanabria, C.; Santolalla, M.; Salas, J.; García-Hierro, J. .; Gonzalez, I.; García-Cachan, M. .; et al. Determination of the Precision of the Fatty Acid Analysis of Iberian Pig Fat by Gas Chromatography. Results of a Mini Collaborative Study. *Meat Sci.* **2002**, *60* (1), 103–109.

(32) Endo, Y.; Ohta, A.; Kido, H.; Kuriyama, M.; Sakaguchi, Y.; Takebayashi, S.; Hirai, H.; Murakami, C.; Wada, S. Determination of Triacylglycerol Composition in Vegetable Oils Using High-Performance Liquid Chromatography: A Collaborative Study. *J. Oleo Sci.* **2011**, *60* (9), 451–456.

(33) Nang Lau, H. L.; Puah, C. W.; Choo, Y. M.; Ma, A. N.; Chuah, C. H. Simultaneous Quantification of Free Fatty Acids, Free Sterols, Squalene, and Acylglycerol Molecular Species in Palm Oil by High-Temperature Gas Chromatography-Flame Ionization Detection. *Lipids* **2005**, *40* (5), 523–528.

(34) Pacheco, C.; Palla, C.; Crapiste, G. H.; Carrín, M. E. Simultaneous Quantitation of FFA, MAG, DAG, and TAG in Enzymatically Modified Vegetable Oils and Fats. *Food Anal. Methods* **2014**, *7* (10), 2013–2022.

(35) Wheeler, D. H. Peroxide Formation as a Measure of Autoxidative Deterioration. *Oil Soap* **1932**, *9* (4), 89–97.

(36) Sinnhuber, R.; Yu, T. Characterization of the Red Pigment Formed in the 2-Thiobarbituric Acid Determination of Oxidative Rancidity. *J. Food Sci.* **1958**, *23* (6), 626–634.

(37) Pati, S.; Nie, B.; Arnold, R. D.; Cummings, B. S. Extraction, Chromatographic and Mass Spectrometric Methods for Lipid Analysis. *Biomed. Chromatogr.* **2016**, *30* (5), 695–709.

(38) Sørensen, K. M.; Petersen, H.; Engelsen, S. B. An On-Line Near-Infrared (NIR) Transmission Method for Determining Depth Profiles of Fatty Acid Composition and Iodine Value in Porcine Adipose Fat Tissue. *Appl. Spectrosc.* **2012**, *66* (2), 218–226.

(39) Yang, H.; Irudayaraj, J. Comparison of Near-Infrared, Fourier Transform-Infrared, and Fourier Transform-Raman Methods for Determining Olive

Pomace Oil Adulteration in Extra Virgin Olive Oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2001**, *78* (9), 889.

(40) Tena, N.; Aparicio, R.; García-González, D. L. Thermal Deterioration of Virgin Olive Oil Monitored by ATR-FTIR Analysis of Trans Content. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57* (21), 9997–10003.

(41) Dale, B. M.; Brown, M. A.; Semelka, R. C. *MRI : Basic Principles and Applications*; Wiley-Blackwell, 2015.

(42) Hills, B. *Magnetic Resonance Imaging in Food Science*; Wiley, 1998.

(43) Cobo, M. F.; Deublein, E. J.; Haber, A.; Kwamen, R.; Nimbalkar, M.; Decker, F. TD-NMR in Quality Control: Standard Applications. In *Modern Magnetic Resonance*; 2018; pp 1819–1836.

(44) Jaroszewski, J. W. Hyphenated NMR Methods in Natural Products Research, Part 1: Direct Hyphenation. *Planta Med.* **2005**, *71* (8), 691–700.

(45) Styles, P.; Soffe, N. .; Scott, C. .; Crag, D. .; Row, F.; White, D. .; White, P. C. . A High-Resolution NMR Probe in Which the Coil and Preamplifier Are Cooled with Liquid Helium. *J. Magn. Reson.* **1984**, *60* (3), 397–404.

(46) Johnson, L. F.; Shoolery, J. N. Determination of Unsaturation and Average Molecular Weight of Natural Fats by Nuclear Magnetic Resonance. *Anal. Chem.* **1962**, *34* (9), 1136–1139.

(47) Spyros, A.; Dais, P. ^{31}P NMR Spectroscopy in Food Analysis. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2009**, *54* (3–4), 195–207.

(48) Spyros, A.; Dais, P. Application of ^{31}P NMR Spectroscopy in Food Analysis. 1. Quantitative Determination of the Mono- and Diglyceride Composition of Olive Oils. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48* (3), 802–805.

(49) Cevallos-Cevallos, J. M.; Reyes-De-Corcuera, J. I.; Etxeberria, E.; Danyluk, M. D.; Rodrick, G. E. Metabolomic Analysis in Food Science: A Review. *Trends Food Sci. Technol.* **2009**, *20* (11–12), 557–566.

(50) Mannina, L.; Sobolev, A. P.; Viel, S. Liquid State ^{1}H High Field NMR in Food Analysis. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2012**, *66* (0), 1–39.

(51) Marcone, M. F.; Wang, S.; Albabish, W.; Nie, S.; Somnarain, D.; Hill, A.

Diverse Food-Based Applications of Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Technology. *Food Res. Int.* **2013**, *51* (2), 729–747.

(52) Capitani, D.; Sobolev, A. P.; Mannina, L. Nuclear Magnetic Resonance - Metabolomics. In *Food Authentication*; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK, 2017; pp 177–197.

(53) López-Rituerto, E.; Cabredo, S.; López, M.; Avenoza, A.; Busto, J. H.; Peregrina, J. M. A Thorough Study on the Use of Quantitative ^{1}H NMR in Rioja Red Wine Fermentation Processes. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57* (6), 2112–2118.

(54) López-Rituerto, E.; Avenoza, A.; Busto, J. H.; Peregrina, J. M. Evidence of Metabolic Transformations of Amino Acids into Higher Alcohols through ^{13}C NMR Studies of Wine Alcoholic Fermentation. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58* (8), 4923–4927.

(55) López-Rituerto, E.; Savorani, F.; Avenoza, A.; Busto, J. H.; Peregrina, J. M.; Engelsen, S. B. Investigations of La Rioja Terroir for Wine Production Using ^{1}H NMR Metabolomics. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60* (13), 3452–3461.

(56) López-Rituerto, E.; Avenoza, A.; Busto, J. H.; Peregrina, J. M. NMR Study of Histidine Metabolism during Alcoholic and Malolactic Fermentations of Wine and Their Influence on Histamine Production. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61* (39), 9464–9469.

(57) Sacchi, R.; Addeo, F.; Paolillo, L. ^{1}H And13C NMR of Virgin Olive Oil. An Overview. *Magn. Reson. Chem.* **1997**, *35* (13), S133–S145.

(58) Igarashi, T.; Aursand, M.; Sacchi, R.; Paolillo, L.; Nonaka, M.; Wada, S.; Arata, Y.; Bildsoe, H.; Falcigno, L.; Fauhl, C.; et al. Determination of Docosahexaenoic Acid and n-3 Fatty Acids in Refined Fish Oils by ^{1}H-NMR Spectroscopy: IUPAC Interlaboratory Study. *J. AOAC Int.* **2002**, *85* (6), 1341–1354.

(59) Hatzakis, E.; Agiomyrgianaki, A.; Kostidis, S.; Dais, P. High-Resolution NMR Spectroscopy: An Alternative Fast Tool for Qualitative and Quantitative Analysis of Diacylglycerol (DAG) Oil. *JAOCS, J. Am. Oil Chem. Soc.* **2011**, *88* (11), 1695–1708.

(60) Fragaki, G.; Spyros, A.; Siragakis, G.; Salivaras, E.; Dais, P. Detection of Extra

Virgin Olive Oil Adulteration with Lampante Olive Oil and Refined Olive Oil Using Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy and Multivariate Statistical Analysis. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53* (8), 2810–2816.

(61) García-González, D. L.; Mannina, L.; D'Imperio, M.; Segre, A. L.; Aparicio, R. Using ^{1}H and ^{13}C NMR Techniques and Artificial Neural Networks to Detect the Adulteration of Olive Oil with Hazelnut Oil. *Eur. Food Res. Technol.* **2004**, *219* (5), 545–548.

(62) D'Imperio, M.; Mannina, L.; Capitani, D.; Bidet, O.; Rossi, E.; Bucarelli, F. M.; Quaglia, G. B.; Segre, A. NMR and Statistical Study of Olive Oils from Lazio: A Geographical, Ecological and Agronomic Characterization. *Food Chem.* **2007**, *105* (3), 1256–1267.

(63) Hwang, H.-S. *Advances in NMR Spectroscopy for Lipid Oxidation Assessment*; Springer, 2017.

(64) Barriuso, B.; Astiasarán, I.; Ansorena, D. A Review of Analytical Methods Measuring Lipid Oxidation Status in Foods: A Challenging Task. *Eur. Food Res. Technol.* **2013**, *236* (1), 1–15.

(65) Agiomyrgianaki, A.; Sedman, J.; Van de Voort, F. R.; Dais, P. Cis and Trans Components of Lipids: Analysis by ^{1}H NMR and Silver Shift Reagents. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2012**, *114* (5), 504–509.

(66) Skiera, C.; Steliopoulos, P.; Kuballa, T.; Holzgrabe, U.; Diehl, B. Determination of Free Fatty Acids in Edible Oils by ^{1}H NMR Spectroscopy. *Lipid Technol.* **2012**, *24* (12), 279–281.

(67) Satyarthi, J. K.; Srinivas, D.; Ratnasamy, P. Estimation of Free Fatty Acid Content in Oils, Fats, and Biodiesel by ^{1}H NMR Spectroscopy. *Energy and Fuels* **2009**, *23* (4), 2273–2277.

(68) Mannina, L.; Luchinat, C.; Emanuele, M. C.; Segre, A. Acyl Positional Distribution of Glycerol Tri-Esters in Vegetable Oils: A ^{13}C NMR Study. *Chem. Phys. Lipids* **1999**, *103* (1–2), 47–55.

(69) Sacchi, R.; Mannina, L.; Fiordiponti, P.; Barone, P.; Paolillo, L.; Patumi, M.; Segre, A. Characterization of Italian Extra Virgin Olive Oils Using ^{1}H-NMR Spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46* (10), 3947–3951.

(70) Longobardi, F.; Ventrella, A.; Bianco, A.; Catucci, L.; Cafagna, I.; Gallo, V.;

Mastrorilli, P.; Agostiano, A. Non-Targeted ^{1}H NMR Fingerprinting and Multivariate Statistical Analyses for the Characterisation of the Geographical Origin of Italian Sweet Cherries. *Food Chem.* **2013**, *141* (3), 3028–3033.

(71) Casey, J. C.; Miles, C. A. Determination of the Fat Content of Meat Using Nuclear Magnetic Resonance. *J. Sci. Food Agric.* **1974**, *25* (9), 1155–1161.

(72) Jakes, W.; Gerdova, A.; Defernez, M.; Watson, A. D.; McCallum, C.; Limer, E.; Colquhoun, I. J.; Williamson, D. C.; Kemsley, E. K. Authentication of Beef versus Horse Meat Using 60 MHz ^{1}H NMR Spectroscopy. *Food Chem.* **2015**, *175* (0), 1–9.

(73) Miklos, R.; Mora-Gallego, H.; Larsen, F. H.; Serra, X.; Cheong, L. Z.; Xu, X.; Arnau, J.; Lametsch, R. Influence of Lipid Type on Water and Fat Mobility in Fermented Sausages Studied by Low-Field NMR. *Meat Sci.* **2014**, *96* (1), 617–622.

(74) Clerjon, S.; Bonny, J. M. NMR Imaging of Meat. In *Modern Magnetic Resonance*; 2018; pp 1609–1628.

(75) Lundberg, P.; Vogel, H. J.; Rudérus, H. Carbon-13 and Proton NMR Studies of Post-Mortem Metabolism in Bovine Muscles. *Meat Sci.* **1986**, *18* (2), 133–160.

(76) Renou, J. P. NMR Studies in Meat. *Annu. Reports NMR Spectrosc.* **1995**, *31* (C), 313–344.

(77) BERTRAM, H. C.; ERSEN, H. J. Applications of NMR in Meat Science. *Annu. Reports NMR Spectrosc.* **2004**, *53*, 157–202.

(78) Castejón, D.; García-Segura, J. M.; Escudero, R.; Herrera, A.; Cambero, M. I. Metabolomics of Meat Exudate: Its Potential to Evaluate Beef Meat Conservation and Aging. *Anal. Chim. Acta* **2015**, *901*, 1–11.

(79) Graham, S. F.; Farrell, D.; Kennedy, T.; Gordon, A.; Farmer, L.; Elliott, C.; Moss, B. Comparing GC–MS, HPLC and ^{1}H NMR Analysis of Beef Longissimus Dorsi Tissue Extracts to Determine the Effect of Suspension Technique and Ageing. *Food Chem.* **2012**, *134* (3), 1633–1639.

(80) Jung, Y.; Lee, J.; Kwon, J.; Lee, K.-S.; Ryu, D. H.; Hwang, G.-S. Discrimination of the Geographical Origin of Beef by ^{1}H NMR-Based Metabolomics. *J.*

Agric. Food Chem. **2010**, *58* (19), 10458–10466.

(81) Sacco, D.; Brescia, M. A.; Buccolieri, A.; Jambrenghi, A. C. Geographical Origin and Breed Discrimination of Apulian Lamb Meat Samples by Means of Analytical and Spectroscopic Determinations. *Meat Sci.* **2005**, *71* (3), 542–548.

(82) García-García, A. B.; Lamichhane, S.; Castejón, D.; Cambero, M. I.; Bertram, H. C. ^{1}H HR-MAS NMR-Based Metabolomics Analysis for Dry-Fermented Sausage Characterization. *Food Chem.* **2018**, *240*, 514–523.

(83) Mati, M.; Staruch, L.; Šoral, M. Use of NMR Spectroscopy in the Analysis of Carnosine and Free Amino Acids in Fermented Sausages during Ripening. *Chem. Pap.* **2015**, *69* (10), 1319–1324. 2015-0148.

(84) Straadt, I. K.; Aaslyng, M. D.; Bertram, H. C. Assessment of Meat Quality by NMR-an Investigation of Pork Products Originating from Different Breeds. *Magn. Reson. Chem.* **2011**, *49* (SUPPL. 1).

(85) Prema, D.; Pilfold, J. L.; Krauchi, J.; Church, J. S.; Donkor, K. K.; Cinel, B. Rapid Determination of Total Conjugated Linoleic Acid Content in Select Canadian Cheeses by ^{1}H NMR Spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61* (41), 9915–9921.

(86) Zanardi, E.; Caligiani, A.; Padovani, E.; Mariani, M.; Ghidini, S.; Palla, G.; Ianieri, A. Detection of Irradiated Beef by Nuclear Magnetic Resonance Lipid Profiling Combined with Chemometric Techniques. *Meat Sci.* **2013**, *93* (2), 171–177.

(87) Siciliano, C.; Belsito, E.; De Marco, R.; Luisa Di Gioia, M.; Leggio, A.; Liguori, A. Quantitative Determination of Fatty Acid Chain Composition in Pork Meat Products by High Resolution ^{1}H NMR Spectroscopy. *Food Chem.* **2013**, *136*, 546–554.

(88) Martínez-Yusta, A.; Goicoechea, E.; Guillén, M. D. A Review of Thermo-Oxidative Degradation of Food Lipids Studied by ^{1}H NMR Spectroscopy: Influence of Degradative Conditions and Food Lipid Nature. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2014**, *13* (5), 838–859.

CAPÍTULO 3
OPTIMIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE RMN PARA EL ANÁLISIS DE EMBUTIDOS

Contenido

3.1 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA 65
3.2 EXTRACTO LIPOSOLUBLE 66
3.3 SELECCIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN 69
3.4 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA PARA EL ANÁLISIS POR RMN 75
3.5 PARÁMETROS DE ANÁLISIS 76
3.6 LIMITACIONES DE LA TÉCNICA: SOLAPAMIENTOS 82
3.7 DESACOPLAMIENTO DE SEÑALES EN RMN 92
3.8 REACTIVOS DE DESPLAZAMIENTO 95
3.9 DERIVATIZACIÓN 97
3.10 INTERPRETACIÓN DEL ESPECTRO 101
3.11 CONCLUSIONES 103
3.12 BIBLIOGRAFÍA 104

"Un experto es una persona que ha cometido todos los errores que pueden cometerse en un campo muy reducido"

Niels Bohr

3.1 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Los embutidos son sólidos heterogéneos. Esta consideración, aparentemente obvia, es sumamente relevante a la hora de plantear el análisis de estos productos, sobre todo, en lo que respecta a la preparación de la muestra.

Para lograr una muestra representativa de embutido, según nuestra experiencia, la cantidad de muestra de partida a homogeneizar debe ser abundante. Normalmente, se utiliza en torno a 150 g de producto para elaborar cada homogeneizado. Asimismo, se utilizan trozos de muestra de todas las partes del embutido para lograr una mejor representatividad. Partir de cantidades pequeñas o muestrear sólo una pequeña parte del producto podría comprometer los resultados. No hay que olvidar que la materia prima incluye carnes de diferentes zonas del animal y cuyas características son muy diferentes entre sí, como, por ejemplo, la grasa subcutánea y la grasa intramuscular. Además, por efecto de la gravedad, la parte inferior de los embutidos suele contener algo más de humedad; y esto también puede repercutir en el grado de evolución de la maduración.

En condiciones experimentales, durante esta investigación, la preparación del homogeneizado comenzó con un muestreo representativo de la pieza de embutido, cortando porciones (rodajas) de todas las zonas del embutido hasta obtener unos 150 g aproximadamente. Posteriormente, se trituraron con una picadora de cuchillas giratorias (Moulinex, type D55, 750 W) hasta lograr una pasta con tamaño de partícula inferior a 2 mm. El homogeneizado queda así preparado para la siguiente etapa de extracción (Imagen 3.1).

Imagen 3.1: Homogeneizado de embutido (chorizo).

3.2 EXTRACTO LIPOSOLUBLE

Los embutidos son mezclas complejas de sustancias, donde predominan las proteínas y las grasas. Para obtener mejores resultados analíticos, separar ayuda a resolver. Gracias a la diferente solubilidad de los componentes, es posible llevar a cabo la discriminación y separación de la fracción grasa presente en el alimento. Utilizando los disolventes apropiados, se logra solubilizar los triglicéridos y otras grasas en lo que se conoce como **extracto liposoluble**. Para que esta extracción sea eficiente, se utilizan diferentes estrategias para facilitar la solubilización.

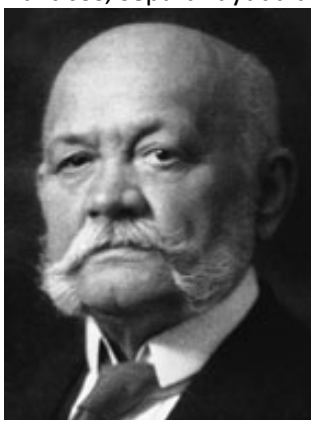


Imagen 3.2: Franz von Soxhlet.

Históricamente, el procedimiento más clásico de extracción de grasas es el método Soxhlet[1] (Imagen 3.2). En esencia, consiste en hacer numerosos lavados

de la muestra (percolación) con un disolvente no polar como hexano o éter de petróleo. Operativamente, mediante ciclos de sifonado y reciclado del disolvente, pueden realizarse del orden de 15 lavados por hora y suele ser necesario prolongar la extracción entre 4 y 16 horas, dependiendo de la matriz a analizar. Además de ser un método bastante lento, requiere de una deshidratación previa y del triturado de la muestra en partículas pequeñas para aumentar la superficie de contacto. Hoy en día, existen equipos de laboratorio que mejoran y aceleran el proceso de extracción, logrando reducir significativamente los tiempos de procesado (de 40 a 180 min). No es muy eficaz extrayendo los lípidos de membrana (a no ser que se realice una hidrólisis previa de la muestra). Tampoco es indicado para extraer lípidos polares.

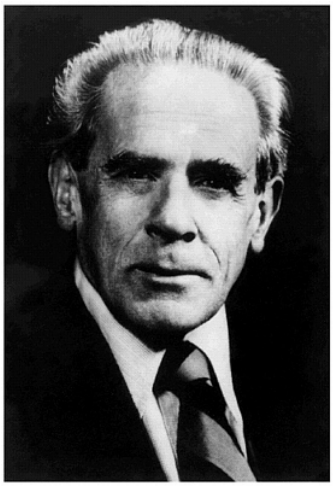


Imagen 3.3: Jordi Folch i Pi.

En análisis de grasas presentes en tejidos biológicos, el método Soxhlet presenta limitaciones. Para extraer los lípidos de membrana y los lípidos más polares se aplica el método Folch[2] (Imagen 3.3).Se basa en una mezcla de cloroformo y metanol. El cloroformo tiene una polaridad intermedia y el metanol ayuda a romper los enlaces de hidrógeno y las fuerzas electrostáticas.

En este método, la muestra a extraer se homogeniza con 20 veces su volumen de una mezcla de cloroformo-metanol (2:1). Tras filtrar para retirar los sólidos, el filtrado es lavado vigorosamente con una quinta parte en volumen de disolución de cloruro sódico 0.05 M y se dejan separar las fases. La fase inferior, que contiene la práctica totalidad de los lípidos, es una mezcla ternaria de cloroformo, metanol y agua en proporciones 86:14:1. Por otro lado, la composición de la fase superior es 3:48:47, respectivamente, y recoge al resto de componentes no lipídicos.

Existen otras variantes del método Folch, como, por ejemplo, el método Bligh-Dyer,[3] que también se basa en las mezclas cloroformo-metanol, si bien propone una relación disolvente-muestra más ajustada, con menos gasto de disolvente.

La ventaja de esta mezcla cloroformo-metanol radica en que permite la extracción de lípidos polares y no polares al mismo tiempo. Las condiciones óptimas de extracción se cumplen cuando el agua presente en la muestra, o el agua añadida, forman junto a los otros dos disolventes una disolución monofásica. La adición a posteriori de más agua provoca un sistema bifásico y se posibilita la separación.

Tanto el método Folch como el método Bligh-Dyer fueron inicialmente concebidos para su uso en la investigación de las grasas presentes en tejidos biológicos. Puesto que en los alimentos siguen presentes estos mismos tejidos, no es de extrañar que también se hayan aplicado en el estudio de la fracción grasa de alimentos, principalmente por su capacidad de extraer todo tipo de lípidos.

Algunas revisiones del método Folch proponen sustituir el cloroformo por disolventes menos tóxicos. Así, por ejemplo, Hara[4] propone el uso de la mezcla hexano/isopropanol (3:2) y Matyash[5] propone el uso de éter metil *terc*-butílico (MTBE)

Aparte de la selección de disolventes y sus proporciones, existen otros aspectos a considerar a la hora de mejorar la capacidad de extracción de un método. No hay que olvidar que el proceso de extracción se fundamenta en la interacción entre un líquido (disolvente) y un sólido (muestra) y que, por tanto, cualquier estrategia que mejore y potencie esta interacción permitirá incrementar la eficiencia.

La aplicación de métodos mecánicos de agitación-dispersión permite que se maximice el contacto entre muestra y disolvente. La mayoría de métodos de extracción los aconsejan. Para este fin, se pueden utilizar muchos tipos de agitación, incluyendo las típicas placas agitadoras con barra magnética, sistemas de vaivén, agitadores de vórtex o incluso métodos más intensos como cuchillas giratorias de alta velocidad. Esta última aproximación permite, además, disminuir aún más el tamaño de partícula e incrementar la superficie de contacto.

En línea con el objetivo de incrementar la eficiencia de la extracción, existen sistemas mejorados de extracción que utilizan microondas y aprovechan su potencial de acelerar la solubilización.[6]

Otros sistemas aplican altas presiones al proceso.[7] La extracción con fluidos presurizados (*pressurized fluid extraction*, PFE) también referida a veces como extracción acelerada con disolventes (*accelerated solvent extraction*, ASE) aplica presión al sistema y aumenta la temperatura y la velocidad de difusión para favorecer la solubilización. Llevando esta estrategia al extremo, la extracción con CO_2 supercrítico permite, además, prescindir de disolventes orgánicos.[8]

Finalmente, también se obtienen ventajas del uso de los ultrasonidos.[9] Los fenómenos de cavitación inducidos por la sonicación generan puntualmente altas presiones y temperaturas que facilitan la extracción.

3.3 SELECCIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN

En este apartado se compararon varias técnicas de extracción con el fin de seleccionar el más apropiado para nuestro trabajo de investigación.

La metodología de extracción a aplicar durante el proyecto debe ser eficaz y repetible, pero además debe ser simple y rápida; en sintonía con la rapidez del análisis por RMN. Si la extracción resultase demasiado compleja o costosa, se convertiría en un cuello de botella y restaría utilidad a la técnica.

La técnica Soxhlet no es buena candidata para nuestros propósitos. En su variante más tradicional es extremadamente larga y requiere de un secado previo. Existen sistemas modernos, incluso semiautomatizados, que mejoran la eficiencia de la extracción y disminuyen los tiempos, pero se trata de una equipamiento muy específico y costoso. Algo similar ocurre con la técnica de extracción de fluidos presurizados o con la técnica de microondas.

La aplicación del método Folch (o sus variantes) es relativamente sencilla a efectos prácticos y puede llevarse a cabo con materiales comunes de laboratorio. La muestra y el disolvente se mezclan, preferentemente aplicando agitación-dispersión mecánica. En nuestro caso, se utilizó una batidora (Braun, type 4191, 600 W). Tras filtrar y retirar la parte insoluble de la muestra, se procede a separar

las dos fases. La fase orgánica se seca sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtra, y por último se retira el disolvente en el rotavapor.

A continuación, se describe la aplicación de método Folch en la extracción de muestras de embutido: A 10 g de muestra se le añaden 200 mL de una mezcla $CHCl_3$/MeOH 2:1. Se mezcla con la batidora durante unos 2 min. El filtrado posterior de los sólidos puede durar 15-30 min (si la filtración es por gravedad) o 2 min si se realiza con filtración a vacío. Se añaden 40 mL de NaCl 0.05 M y se agita. La separación de fases puede costar 15-30 min si se realiza con embudo de decantación o se puede reducir a 5 min en el caso de usar tubos de centrífuga. Finalmente, el tratamiento con desecante de la fase inferior puede durar otros 5-10 min y la consiguiente filtración entre 15-30 (gravedad) o 2 min (vacío). La eliminación de disolvente en el rotavapor supondría otros 10 min adicionales y, para eliminar los restos de disolvente, 20 min en bomba de vacío. El tiempo total oscila entre 1 y 2 h por muestra. En el caso de realizar varias extracciones a la vez, las operaciones se pueden intercalar para optimizar los tiempos, siendo posible que un solo analista realice hasta 6 extracciones en 4 h.

En el caso de optar por la variante de Bligh-Dyer, el procedimiento es el siguiente: A 25 g de muestra se le añaden 15 mL de agua y 100 mL de MeOH y es mezclado con la batidora durante 2 min. A continuación, se añaden 50 mL de $CHCl_3$ y se mezcla durante otros 2 min. De nuevo, se añaden otros 50 mL de $CHCl_3$ y se agita por 30 s más. Se añaden 70 mL de agua y se agita por 30 s. La mezcla es filtrada, se separan las fases y la fase inferior es desecada usando Na_2SO_4 anhidro, y se procede como de costumbre. La duración aproximada de cada extracción es similar al método Folch.

Ambos métodos basados en cloroformo/metanol fueron probados en la extracción de muestras de embutido con buenos resultados de repetibilidad y robustez. Se llevaron a cabo réplicas de extracción de una misma muestra con cada uno de los dos métodos. Los resultados fueron comparados entre sí superponiendo los espectros de ^{1}H-RMN en MNova y buscando diferencias entre las señales. El procedimiento de análisis con RMN se describirá en detalle más adelante. También se compararon los valores de las integrales de los principales picos, no

apreciándose diferencias entre las réplicas ni tampoco entre los métodos. Ambos procedimientos son útiles para nuestro propósito.

Cuanto menor es el tamaño de partícula de la muestra mayor es la capacidad del disolvente de extraer, pues aumenta la superficie de contacto. Con el fin de mejorar esta capacidad de extracción, se llevaron a cabo algunos experimentos de optimización del triturado. En la trituración de matrices como el embutido, cuando se aplican temperaturas de congelación se logra una mayor solidificación de la muestra, lo que provoca que se vuelve más quebradiza, facilitando la obtención de tamaños de partícula inferiores durante la trituración. Por ello, algunas alícuotas de homogeneizado fueron trituradas de nuevo durante 2 min, pero esta vez sumergidas en N_2 líquido (-196 °C) y utilizando la batidora. Gracias a las bajas temperaturas, el embutido es reducido a pequeñas partículas dispersas y con aspecto de arena fina o pan rallado fino. No obstante, cuando la muestra recupera la temperatura ambiente, las pequeñas partículas se agregan y apelmazan, formando una masa de aspecto muy similar al homogeneizado de origen. Del análisis por RMN de las muestras antes y después del triturado exhaustivo no se pudieron extraer diferencias, lo que indica que un único triturado inicial a temperatura ambiente sería suficiente para nuestro fin.

Hasta este punto, contamos con una metodología de preparación de muestra y de extracción que satisfacen las necesidades del proyecto. No se trata de un procedimiento especialmente largo ni costoso y es relativamente sencillo y conveniente. No obstante, en aras de poder optimizar la capacidad y reducir algo más el tiempo de análisis, se exploró la viabilidad de algunas otras alternativas.

Al revisar la bibliografía sobre trabajos de análisis de grasa en alimentos, es frecuente encontrar estrategias de extracción del tipo Folch o Bligh-Dyer. Otros autores, sin embargo, justifican la utilización de extracciones tipo Soxhlet en productos cárnicos de cerdo,[10] argumentando que los resultados son similares a los obtenidos mediante metodología Folch. Existen otros ejemplos, donde los autores apuestan por el uso de sólo cloroformo en la extracción de embutidos,[11] y evitan la etapa de separación de fases. En otro trabajo, y en línea con el anterior, analizan la grasa de vacuno[12] mediante una extracción con cloroformo deuterado en el propio tubo de RMN. Además del cloroformo, también hay autores que eligen otros

disolventes, como por ejemplo el sulfuro de carbono para extracciones de pescado,[13] o la mezcla éter etílico/heptano 1:1 para el análisis de quesos.[14]

Conviene recordar que métodos de extracción como el de Folch fueron propuestos para el análisis de tejidos biológicos. En esos casos, la capacidad de extraer todo tipo de lípidos es sumamente relevante, pues permite distinguir lípidos que, aunque muy minoritarios, resultan relevantes por estar ligados a la funcionalidad celular. Sin embargo, en análisis de alimentos, y, particularmente, en alimentos grasos como los cárnicos o lácteos, la presencia tan minoritaria de esas grasas especiales frente a la abundancia de grasas de otros tipos hace que, en la práctica, las ventajas del método Folch resulten inapreciables.

A la vista de estas premisas, se decidió probar métodos de extracción simplificados, sin separación de fases, y comprobar su utilidad en nuestro proyecto.

Una simplicación obvia del proceso consiste en utilizar un único disolvente y evitar así la fase de lavado y separación de fases. Disolventes que podrían servir para este fin son, por ejemplo, el cloroformo o también el diclorometano, que es menos tóxico. El proceso simplificado quedaría como sigue: se añaden 150 mL de disolvente ($CHCl_3$ ó CH_2Cl_2) a 25 g de homogeneizado. Se aplica agitación mecánica durante 2 min (Imagen 3.4). Se retiran los sólidos mediante filtración y el filtrado se seca sobre Na_2SO_4 anhidro. Tras filtrar de nuevo, el disolvente se elimina en rotavapor y finalmente, se aplica vacío para retirar los restos de disolvente.

Para verificar la validez del método simplificado, se comparó con el método Folch. Sobre una misma muestra se llevaron a cabo réplicas de extracción con cloroformo, con diclorometano y con el método Folch. Los extractos se analizaron con ^{1}H-RMN, y los espectros se compararon utilizando MNova. Los resultados fueron comparables, en todos los casos y las diferencias apreciadas mínimas. Tan sólo destacar el efecto de la señal residual del disolvente. En el caso de usar cloroformo o el método Folch, la señal del disolvente recae en δ = 7.26 ppm y no interfiere con ninguna otra señal. Sin embargo, en el caso del diclorometano, la señal del disolvente recae en δ = 5.30 ppm y sí que coincide con una señal de la muestra, lo que provoca que la integración de esa señal se vea modificada en parte.

Imagen 3.4: Extracción de homogeneizado de chorizo con cloroformo y dispersión mecánica.

A la vista de estos resultados, se decidió optar por la extracción simplificada con cloroformo como método de preparación del extracto liposoluble. No obstante, antes de fijar el método se decidió explorar más a fondo su robustez.

Una potencial debilidad del método simplificado radica en la inmiscibilidad del agua de la muestra frente el cloroformo. La matriz alimentaria está húmeda y es posible que este agua haga barrera frente a la penetración del disolvente. Sería interesante poder comprobar si este efecto hidrofóbico puede llegar a tener consecuencias. Se decidió comparar la eficacia de la extracción sobre una misma muestra, antes y después de deshidratar. Es importante, no obstante, que el método de deshidratación no altere las características de la muestra; una desecación por calor, o por aire forzado, pueden desencadenar procesos oxidativos y de lipólisis. Es preferible utilizar, por tanto, la liofilización.

Para el experimento de liofilización, se trituró una alicuota de 40 g de homogeneizado sumergida en nitrógeno líquido. La muestra fue trasvasada a un matraz esférico de 250 mL e, inmediatamente, antes de que incrementase la temperatura, fue sometida a liofilización usando el equipo Telstar CRDOS-80. El avance de la deshidratación fue medido mediante la pérdida de masa. La

liofilización no resultó completa y sólo se consiguió eliminar un 23.5% de peso. La muestra retuvo, aproximadamente, un 9% de humedad todavía. La naturaleza grasa de la muestra impidió, al parecer, el adecuado avance de la liofilización.

En cualquier caso, se realizaron extracciones tanto de la muestra parcialmente deshidratada como de la muestra control. El análisis de sendos extractos mediante ^{1}H-RMN no mostró diferencias, lo que confirmaría que el agua naturalmente presente en la muestra no influye negativamente en el método de extracción.

A continuación se muestra gráficamente el procedimiento de elaboración del extracto lipídico (Figura 3.1).

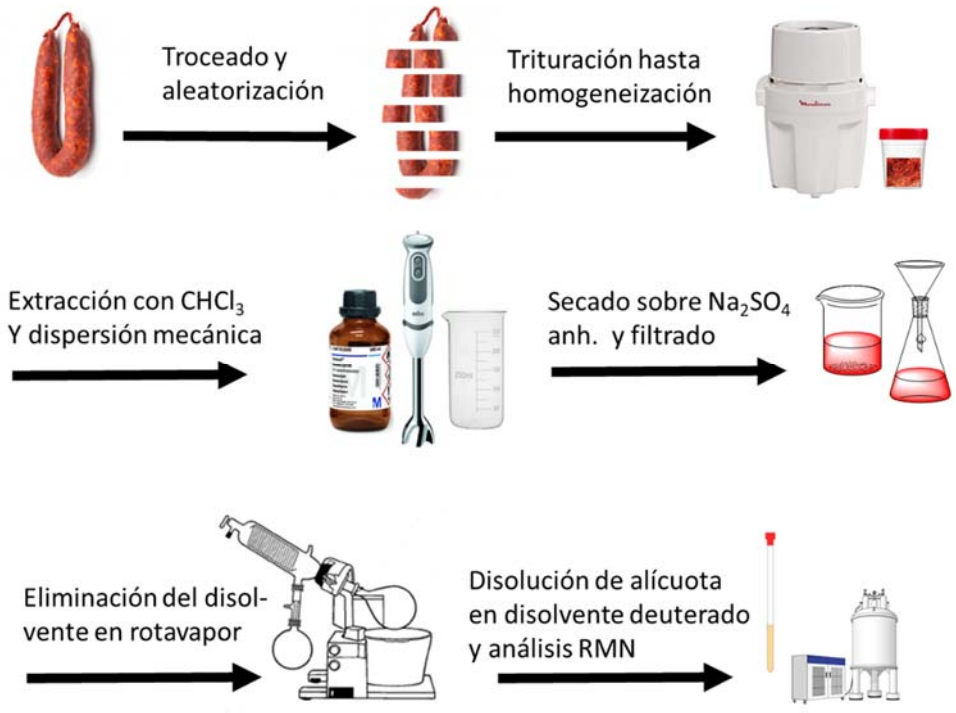


Figura 3.1: Esquema del procedimiento de elaboración del extracto lipídico.

3.4 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA PARA EL ANÁLISIS POR RMN

Para realizar el análisis mediante RMN, se disuelve una pequeña cantidad de muestra en disolvente deuterado, típicamente cloroformo, y se trasvasa al característico tubo alargado. Normalmente, 500-600 μL de disolución son suficientes. Para nuestros análisis disponemos de una cantidad relativamente grande de muestra. En principio, podemos elegir sin limitaciones cuánta cantidad de muestra utilizar en cada análisis. Sin embargo, conviene recordar que la concentración de la muestra tiene un efecto sobre los resultados. Cuando la concentración es baja, la relación señal-ruido es mala y se dificulta la identificación y cuantificación de las señales minoritarias. En el otro extremo, cuando la concentración es alta se consiguen mejores relaciones señal-ruido, pero la línea base se distorsiona lo suficiente como para entorpecer el adecuado ajuste y una apropiada integración de señales. El equilibrio está en encontrar una concentración suficientemente alta para garantizar una buena resolución, pero no tan alta como para afectar a la línea base.

Revisando la bibliografía, el rango de concentraciones que se utiliza en los diferentes trabajos es muy amplio. Algunos autores, como Guillén[15] prefieren muestras más concentradas y mezclan 200 mg de muestra con 400 μL de $CDCl_3$. En el extremo opuesto, Sacchi[16] opta por muestras más diluidas y mezcla 20 μL de muestra con 700 μL de $CDCl_3$ y 20 μL de DMSO-d6.

A la hora de elegir qué concentración usar y para lograr fijar un protocolo de análisis óptimo, fue estudiado el efecto de la concentración de nuestras muestras sobre la calidad del espectro. Se analizaron concentraciones crecientes y los espectros resultantes se compararon en MNova. De manera empírica se llegó a la conclusión de que una concentración balanceada, tanto con buena resolución como buena línea base se obtiene diluyendo 100 mg de muestra por cada 450 μL de cloroformo deuterado. Este resultado experimental coincide, además, con la relación aceite/cloroformo que Bruker propone en sus protocolos oficiales de análisis cuantitativo de aceites.

3.5 PARÁMETROS DE ANÁLISIS

Tradicionalmente, el análisis con RMN ha sido utilizado mayoritariamente en estudios de elucidación estructural. Este tipo de análisis no requieren de altísima precisión y por ello se llevan a cabo, generalmente, aplicando ajustes y parámetros de análisis que priman la rapidez y la efectividad frente a la exactitud. Sin embargo, cuando la RMN se enfoca a estudios de análisis cuantitativo, es necesario optimizar los parámetros de análisis para lograr el máximo de resolución con la mayor precisión y repetibilidad posible.

Tiempo de relajación

En RMN cuantitativa es crucial que la intensidad de las señales sea proporcional y comparable. La intensidad de las señales está condicionada a la relajación experimentada por los núcleos tras cada pulso. Sin embargo, los diferentes protones tienen diferentes tiempos de relajación (T1), variando desde 0.5 a 4 s.

Para garantizar que todas las señales se han relajado completamente, es necesario aplicar una pausa entre pulsos de una duración de al menos 5 veces el tiempo de relajación (T1) de la señal más lenta. Esta pausa se configura experimentalmente, mediante el parámetro d1 (en equipos Bruker) que determina la demora de relajación (*relaxation delay*). Idealmente, d1 = 5 × T1. El valor de d1 puede ser estimado teóricamente calculando los T1 de los diferentes protones de la muestra. Para calcular los tiempos de relajación T1, se utilizan experimentos con secuencias de pulsos de recuperación de la inversión (*inversion recovery*) del estilo 180-τ-90. En los experimentos, el valor de tau se varía desde ángulos pequeños a valores mayores y se deduce T1 mediante cálculos de regresión no-lineal. Alternativamente, d1 puede ser también estimado experimentalmente a partir de la comparación de la intensidad de las señales en espectros realizados a diferentes valores de d1.

Se realizaron 5 análisis consecutivos a una misma muestra de extracto lipídico disuelta en $CDCl_3$, usando todos los parámetros experimentales idénticos, excepto por el valor de d1, que fue modificado a valores de 1, 5, 10, 15 y 20 s. Los 5 espectros

fueron comparados en MNova, apreciándose comportamientos dispares para las diferentes señales presentes en el espectro. En la Figura 3.2 puede verse el detalle, para cada señal, de la superposición de los 5 espectros. La línea roja se corresponde con d1 = 1 s. La línea verde clara es d1 = 5 s. Las líneas verde oscura, azul y violeta son, respectivamente, d1 = 10, 15 y 20 s; aunque aparecen solapadas y son prácticamente indistinguibles. Algunas señales, como las correspondientes a los metilenos del resto glicerol (señal B, 4.13 ppm), no se ven en absoluto afectadas por el cambio de d1, porque su T1 es muy bajo y se consigue la total relajación incluso a tiempos cortos. En el extremo opuesto, la intensidad de las señales correspondientes a los protones olefínicos (señal A, 5.33 ppm) y los protones metilo terminal (señal C, 0.87 ppm) sí se ve afectada por los tiempos de relajación. Estos protones no alcanzan su máxima intensidad hasta que d1 es 10 s o superior.

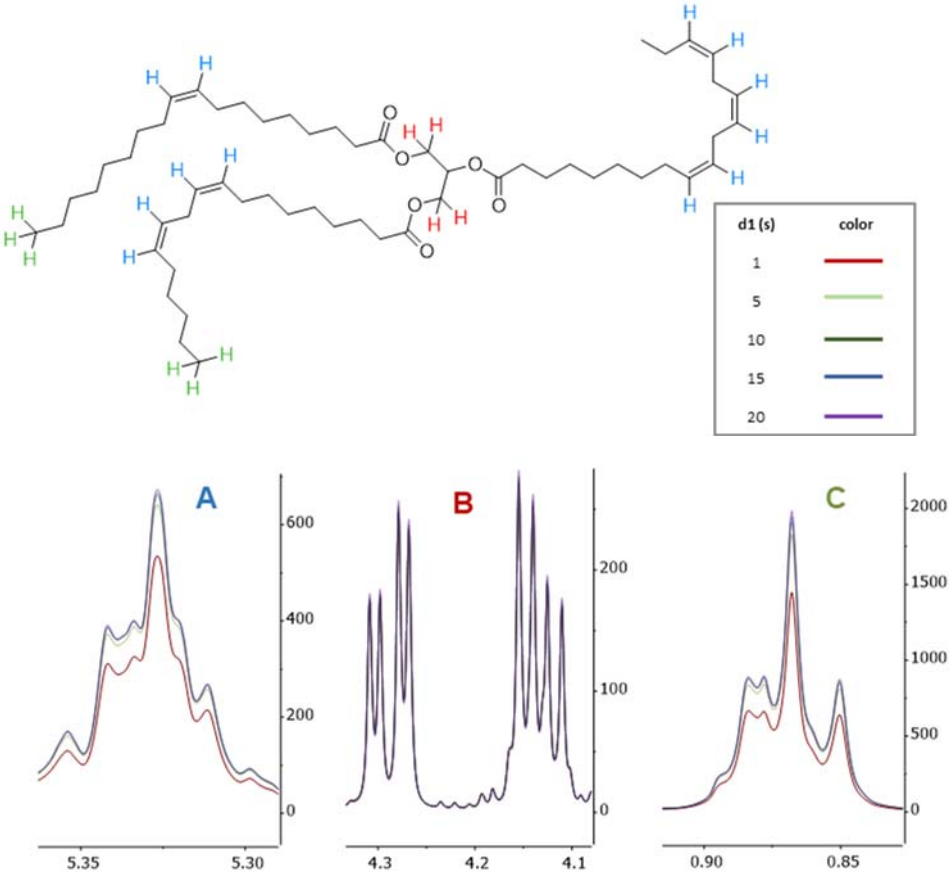
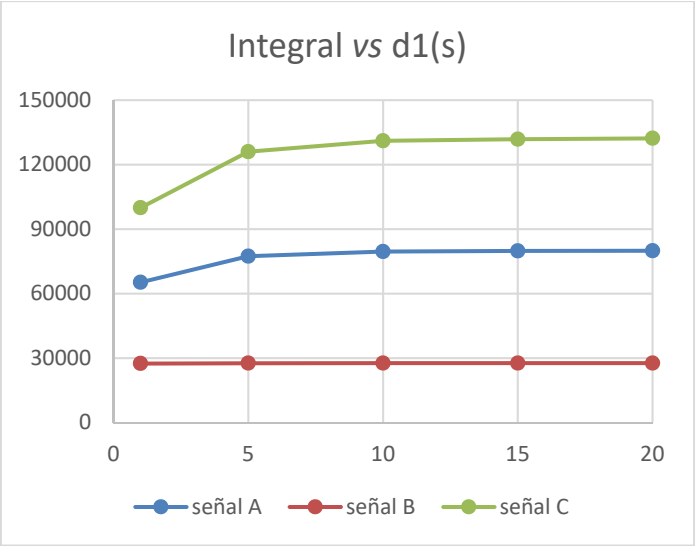


Figura 3.2: Superposición de espectros con valores de d1 = 1, 5, 10, 15 y 20 s para las señales A (5.33ppm), B (4.13ppm) y C (0.,87ppm).

En la Gráfica 3.1 se representan los valores absolutos de las integrales de las citadas señales frente a los diferentes tiempos de d1. Puede apreciarse cómo a partir del valor d1 = 10 s las integrales se mantienen prácticamente constantes, incluso para las señales A y C, más susceptibles. De acuerdo con esta observación, puede considerarse que 10 s es un tiempo suficiente para garantizar la total relajación de todas las señales y es el valor de d1 que se aplicará a lo largo de todo el estudio.



Gráfica 3.1: Valores absolutos de las integrales de las señales A, B y C en función de los diferentes tiempos de d1.

Número de scans (ns)

Siguiendo con la optimización de los parámetros experimentales, la relación señal/ruido, o lo que es lo mismo, la intensidad de las señales, puede mejorarse aumentando el valor del parámetro ns (*number of scans*); esto es, acumulando varias lecturas (*scans*) y superponiendo los datos. Como limitación, el *ns* repercute directamente en la duración total del análisis. En consecuencia, es necesario encontrar el equilibrio entre calidad de señales y duración de experimento. Además, conviene recordar que el incremento de la relación señal/ruido (*s/n*) es proporcional a la raíz cuadrada del número de scans. Así, por ejemplo, para lograr duplicar el valor de *s/n* sería necesario cuadruplicar el ns.

En nuestro procedimiento experimental, cuando d1 = 10 s, cada *scan* dura 12 s. Tomemos como referencia de partida la intensidad de una señal tras 1 *scan* (ns = 1, 12 s). Mejorar la señal (duplicar la intensidad) requerirá de 4 *scans* (48 s). Volverla a mejorar, 16 *scans* (193 s), y así sucesivamente. Esto se traduce en que con ns inferiores a 24 el incremento de señal respecto al tiempo sea muy favorable, pero

que a partir de ns superiores a 128 la mejora de calidad no sea sustancialmente mayor, pese al enorme incremento de tiempo experimental.

Si el tiempo no fuese un factor limitante, podrían aplicarse valores de ns cada vez mayores, pero en la práctica es necesario considerar el coste en tiempo que implica. Buscando el equilibrio entre sensibilidad y tiempo, en nuestros análisis optamos por un valor de ns de 64 *scans*. El tiempo total de experimento es razonable, inferior a 13 min., y el incremento de resolución es suficiente; multiplicando por 8 la intensidad de las señales. En la Figura 3.3, se representa un ejemplo de la mejora de relación señal/ruido obtenida gracias al aumento del número de *scans*.

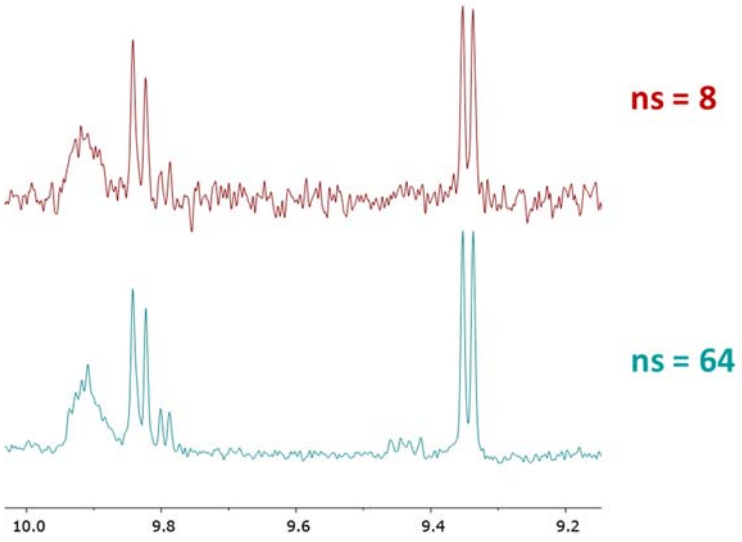


Figura 3.3: Detalle de la mejora de resolución de señales y aumento de la relación señal/ruido gracias al incremento del parámetro ns.

Procesado del espectro

La forma en que se procesan los datos crudos de RMN afectan de manera notable a la resolución y sensibilidad. Un correcto procesado repercute en la mejora de la anchura de las señales y de la relación señal/ruido.

El efecto de la magnetización sobre los átomos es registrado por el equipo en forma de una señal oscilante que decae a lo largo del tiempo debido al efecto de la relajación. Esta señal, conocida como FID (*free induction decay*) es una función dependiente del tiempo. La transformada de Fourier de esta señal es la que nos genera el espectro como una función dependiente de la frecuencia.

Al registrar la FID también se registra ruido. La intensidad de la FID decae con el tiempo, pero el ruido permanece constante. A causa de ello, tan sólo registramos ruido cuando la FID ha decaído lo suficiente. Para no introducir más ruido del necesario y puesto que la mayor parte de la información está contenida en la primera parte de la señal, se ajusta el tiempo de adquisición para no alargar la señal más de lo necesario y no introducir ruido adicional.

Una estrategia habitual para mejorar la relación señal/ruido consiste en la apodización. Se multiplica la FID por una función exponencial de manera que la primera parte de la FID, la que contiene más información, se magnifica, y la última parte de la FID; que contiene más ruido, se minimiza. La apodización con funciones exponenciales tiene un límite porque se acelera el decaimiento de la FID y esto repercute en el ensanchamiento de señales. En nuestros experimentos aplicamos apodización exponencial con 0.3 Hz de ensanchamiento de línea, que resulta en un buen compromiso entre mejora de sensibilidad (señal/ruido) y pérdida de resolución (ensanchamiento de señales)

con el fin de mejorar la forma de las señales, otros tipos de funciones pueden ser aplicadas en apodización: de tipo gausiano, de tipo campana seno, etc.. MNova incluye una función de apodización llamada *stanning* que logra muy buenos resultados en la reducción de ruido sin apenas repercutir en la forma de la señal. En nuestros experimentos aplicamos esta función con un factor 10.

Otra estrategia para mejorar el espectro consiste en el llenado con ceros (*zero filling*). En la transformación de la FID (analógica) a datos digitales la curva es muestreada a intervalos regulares y representada como una serie de puntos. Al hacer la transformada de Fourier, el espectro también es una serie de puntos, aunque a efectos prácticos sea representado como la línea que une estos puntos. Al añadir a la FID un número de ceros igual al número de datos presentes se logra

que existan el doble de puntos para representar la línea del espectro. El rellenado con ceros no mejora la resolución realmente, pero logra una mejor representación y señales mejor definidas. En nuestros experimentos hacemos un rellenado de ceros hasta 128 Kb.

El procesado del espectro incluye también el ajuste de fase, que es realizado de forma manual asignando como punto de pivote el pico más alto del espectro. Para lograr buenos resultados en el ajuste de fase, el espectro completo es ampliado en torno a 10 veces para apreciar al detalle las incorrecciones de fase.

Para el ajuste de la línea base se utiliza una rutina manual. Se aplica primero la función de MNova de "seleccionar bordes" para que el programa seleccione de forma automática unos pocos puntos de control en los bordes. A continuación, con la función "seleccionar pico" se seleccionan manualmente unos 20 puntos adicionales sobre las zonas del espectro donde mejor se aprecia la línea base, principalmente entre 8 y 15 ppm y entre -4 y 0 ppm. El algoritmo *cubic splines* proporciona muy buenos resultados generando la curva que pasa por todos los puntos de control. Se seleccionan los puntos de control que sean necesarios hasta lograr que la curva de la línea se ajuste convenientemente y se logre un buen solapamiento entre la línea base observada y la función de ajuste. Finalmente, se aplica la herramienta "referenciar" para asignar a la señal del TMS el valor de 0 ppm.

La integración de las señales se realiza de forma manual, aplicando un valor de referencia de 2000 a la señal a 2.3 ppm, correspondiente al metileno en el carbono 2 de las cadenas acílicas.

3.6 LIMITACIONES DE LA TÉCNICA: SOLAPAMIENTOS

Hasta este punto, los parámetros experimentales han sido optimizados para lograr mejor proporcionalidad y representatividad de señales, y también mejor sensibilidad o mayor relación señal/ruido. Esto va a procurar que la detección y cuantificación de las señales sea más precisa. Sin embargo, estas dos

optimizaciones no consiguen resolver un problema muy habitual en mezclas complejas: **los solapamientos**. Dentro del espectro de ^{1}H-RMN coexisten señales que, por su anchura y por estar muy próximas en desplazamiento químico, se solapan entre sí, total o parcialmente, dificultando la discriminación de las señales u obligando a asumir una cierta aproximación a la hora de integrar las señales por separado.

Muchos de los protones presentes en la muestra están acoplados con otros protones próximos. Los acoplamientos entre protones causan multiplicidad (doblete, triplete, multiplete, etc.) y un correspondiente ensanchamiento de las señales, tanto mayor cuanto mayor sea la constante de acoplamiento (*J*). En estas circunstancias, con señales complejas y más anchas, es más probable que se produzcan solapamientos entre señales adyacentes. Este problema se agrava cuanto menor sea la frecuencia de Larmor del equipo. De hecho, cuando se utilizan equipos de 600 MHz o de más campo la mayoría de los problemas de solapamiento se solucionan. Desgraciadamente, esta solución es poco realista, pues se trata de equipos muy costosos en adquisición y mantenimiento. Lo ideal es poder contar con una solución que minimice el problema de los solapamientos en equipos más convencionales, de 400 MHz, como el utilizado en este estudio.

A continuación, se describirán los diferentes solapamientos que tienen lugar cuando analizamos grasas con un equipo de RMN de 400 MHz.

En primer lugar, se producen solapamientos entre señales de protones que tienen entornos químicos similares. Así, por ejemplo, los protones del metilo terminal de las cadenas de ácidos grasos tienen un comportamiento prácticamente idéntico, aunque provengan de ácidos grasos de cadena larga o corta, saturados o insaturados, en posición 1, 2 ó 3 de glicerol… Como resultado, en el espectro aparece una única señal pseudo-triplete a 0.87 ppm y que agrupa a los metilos de las cadenas acílicas saturadas e insaturadas omega-6 y omega-9. Como excepción, los metilos de los ácidos grasos omega-3, a causa del efecto del doble enlace próximo, generan una señal separada, a 0.95 ppm. También originan una señal diferenciada los metilos terminales de los ácidos grasos trans, que aparecen a 0.91 ppm (Figura 3.4**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). Todas estas

señales aparecen relativamente próximas en el espectro y a causa de su anchura, se produce un leve solapamiento.

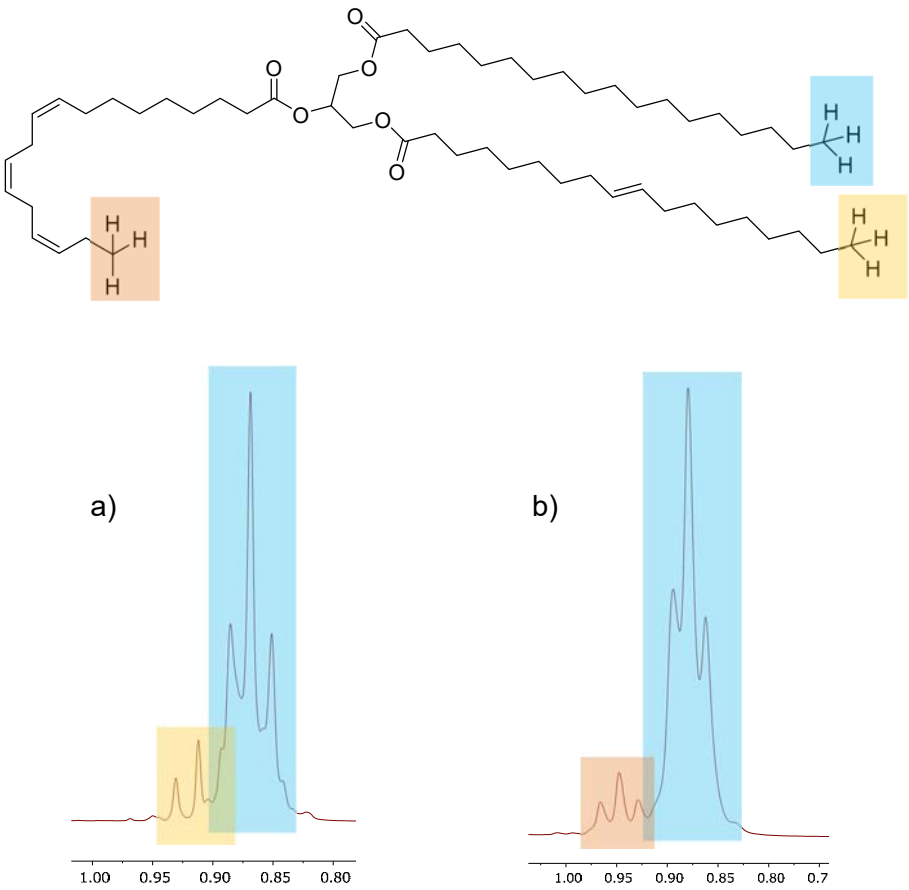


Figura 3.4: Señales de –CH_3 en grasas, a) solapamiento con grasas trans, b) solapamiento con grasas omega-3.

No obstante, en ausencia de grasas *trans*, la señal de los omega-3 puede ser integrada independientemente del resto de señales. Esta característica resulta muy útil, pues permite distinguir, por comparación, la proporción de omega-3 en la muestra.

En resumen, desde el punto de vista operativo, este solapamiento masivo de señales no dificulta la interpretación de resultados puesto que logra agrupar

señales similares entre sí. Adicionalmente, gracias a las leves diferencias presentes en sustancias de interés, como en el ejemplo de los omega-3, se abre la posibilidad de poder discriminar y cuantificar algunos tipos concretos de grasa.

Este fenómeno de solapamiento masivo de protones equivalentes no es exclusivo de los metilos. Los diferentes grupos metileno (-CH_2-) de la cadena acílica pueden ser identificados en función de su posición. Así, por ejemplo, los protones del metileno en posición adyacente al carbonilo en las cadenas acílicas (protones en C2) tienen un comportamiento químico prácticamente idéntico. Como resultado, en el espectro aparece una única señal pseudo-triplete a 2.31 ppm, con la excepción de los protones en C2 de DHA, que no coinciden en desplazamiento químico debido al efecto del doble enlace próximo (Figura 3.5).

Igualmente sucede con los protones en C3, que se agrupan en un único multiplete, a 1.61 ppm, si bien pueden diferenciarse las señales propias de EPA y ARA. Los protones en C3 de DHA tienen, también, un comportamiento diferente, y aparecen junto con los C2 de DHA (Figura 3.5).

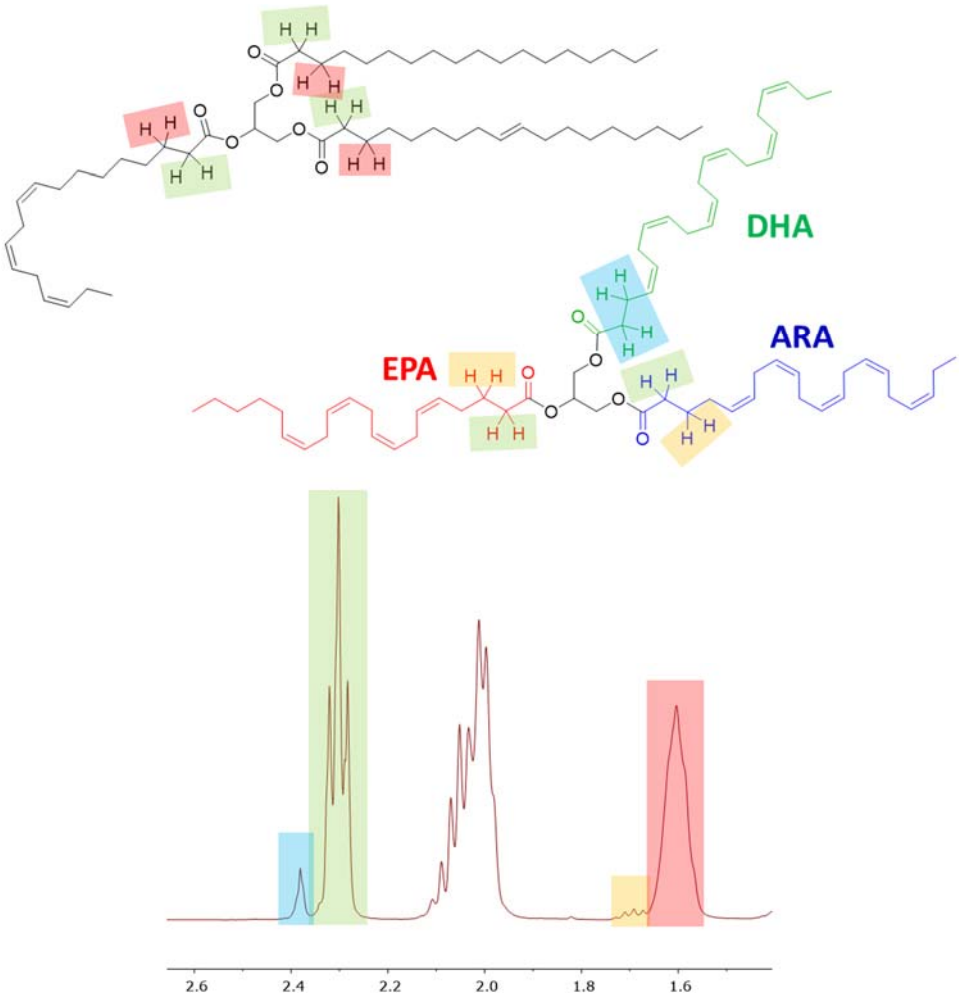


Figura 3.5: Detalle de las señales de los metilenos en C2 y C3.

Los protones alílicos son aquellos presentes en los metilenos en posición α respecto a un sólo doble enlace. Se agrupan en una única señal en torno a 2.02 ppm. Por otro lado, los protones bis-alílicos (que están en posición α respecto a dos dobles enlaces) generan señales diferentes, a 2.77 y 2.81 ppm, en función de si provienen de ácidos grados di-insaturados (linoleico, por ejemplo) o tri-insaturados (linolénico, por ejemplo). Estas señales están solapadas aunque son casi distinguibles (Figura 3.6). Equipos de más de 500 MHz pueden discriminar

eficazmente los dos tipos de señales, pero con campos más bajos tratar de integrar por separado supone asumir una cierta incertidumbre.

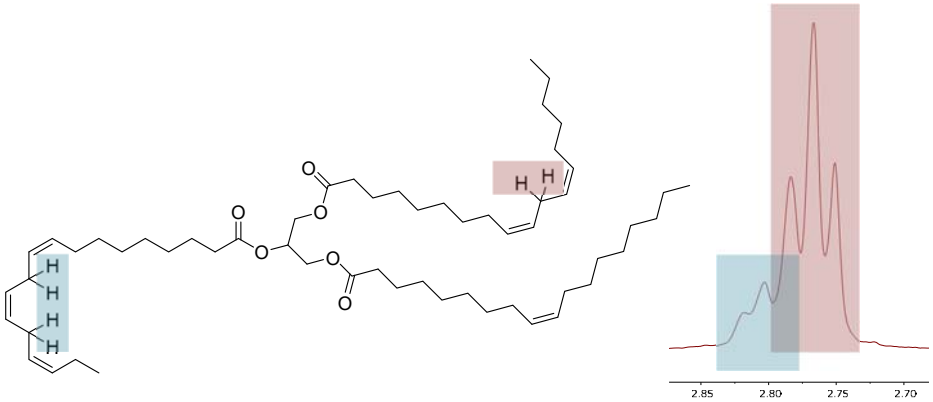


Figura 3.6: Solapamiento de –CH_2– bis-alílicos.

Para el resto de metilenos diferentes a los C2, C3, alílicos y bis-alílicos se obtiene una señal (la más grande el espectro) en torno a 1.26 ppm.

Aparte del metilo y los diferentes metilenos, las únicas señales restantes del resto acílico se corresponden con los protones olefínicos de los ácidos grasos insaturados. De nuevo, éstos también se agrupan en una única señal en torno a 5.34 ppm. Aunque mayoritariamente en las grasas sólo hay presentes dobles enlaces *cis*, también pueden aparecer pequeñas cantidades de grasas *trans*. La señal de los protones olefínicos *trans* (5.38 ppm) se solapa con la señal mayoritaria de los *cis* dificultando enormemente su discriminación (Figura 3.7).

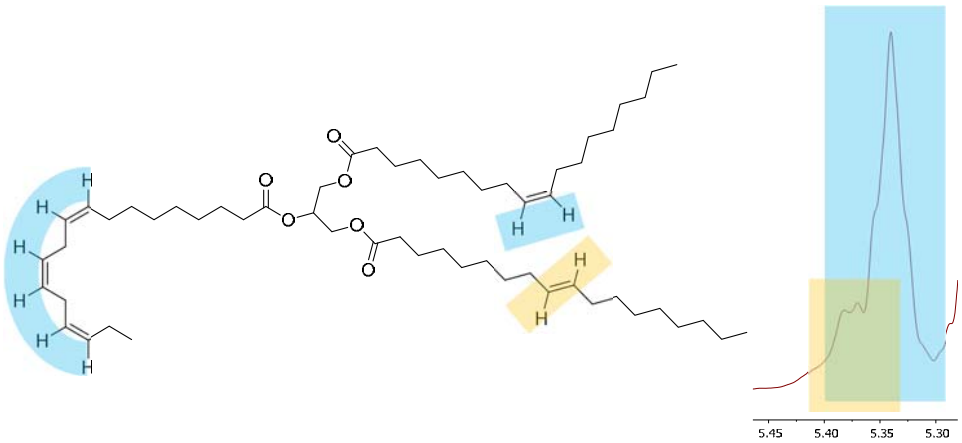


Figura 3.7: Señales de olefínicos cis y trans.

Para muestras con un contenido relativamente alto de grasa *trans* puede aplicarse una estimación que permite un cálculo aproximado: se integra la señal completa y se integran también por separado, cada uno de los flancos de la señal. La diferencia de valor entre los dos flancos, puesto que la señal es simétrica, se corresponde aproximadamente con la aportación de las grasas *trans* a la señal.

Respecto a las señales del resto glicerol, los protones de los carbonos en los extremos (*sn*-1 y *sn*-3) se solapan en una señal que asemeja a un doblete de doblete de dobletes (ddd), mientras que el protón unido al carbono central (*sn*-2) origina un multiplete a 5.26 ppm, que se solapa ligeramente con la señal de los protones olefínicos (Figura 3.8).

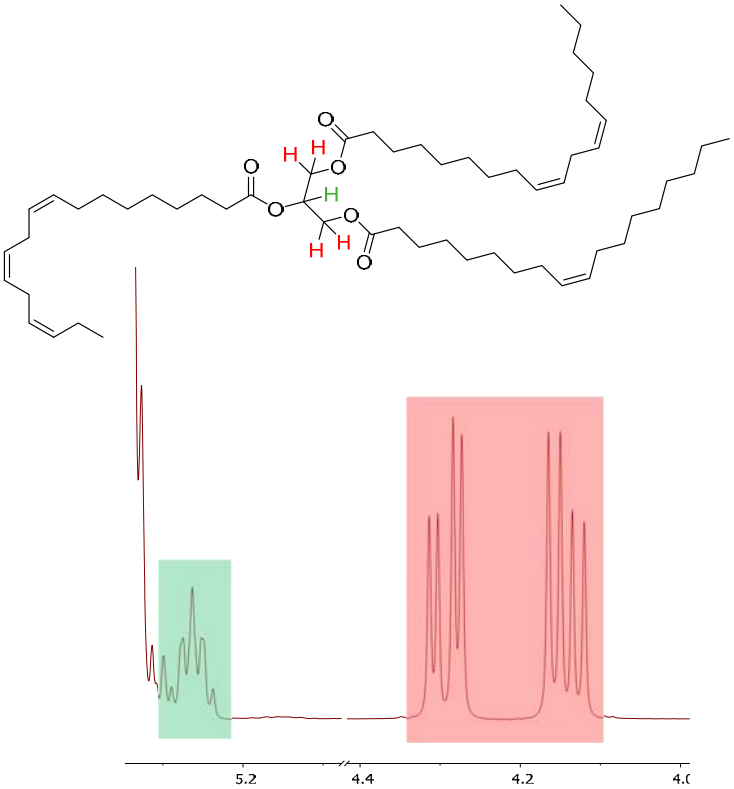


Figura 3.8: Señales propias del resto glicerol en ^{1}H-RMN de grasas.

Pero el peor escenario lo encontramos en lo referente a las señales de los productos de lipólisis como diacilgliceroles o monoacilgliceroles (muy minoritarios respecto a los triglicéridos). El multiplete entre 4.0 y 4.4 ppm originado por los –C$\underline{H}_2$OR de los triglicéridos oculta completamente a los –C$\underline{H}_2$OR de los mono y diglicéridos, imposibilitando su detección. Por fortuna, algunas de las otras señales propias de estas sustancias no están solapadas y es posible así la cuantificación para todos ellos. Excepto para los 1,3-diglicéridos, cuyo protón central >C$\underline{H}$OH también se ve parcialmente solapado por la señal mayoritaria de los triglicéridos (Figura 3.9)

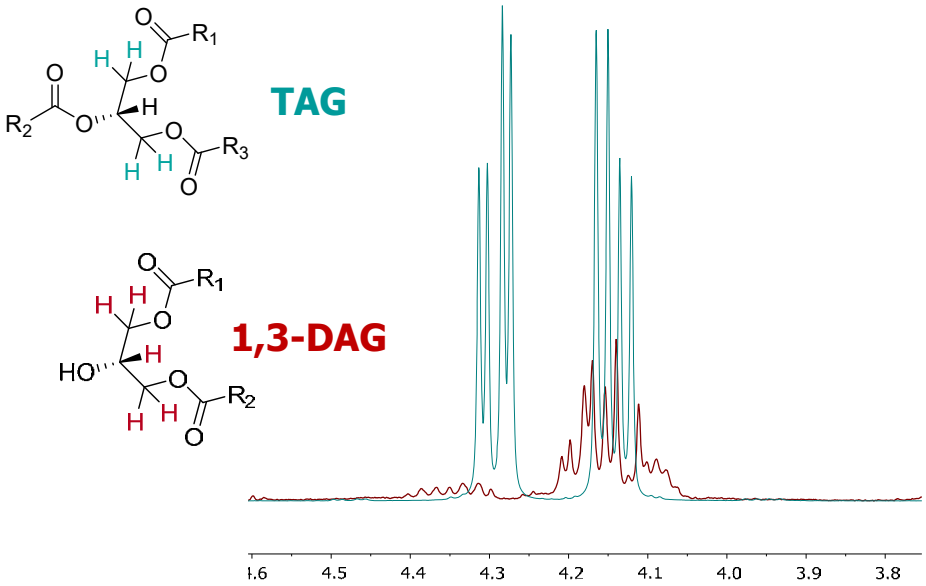


Figura 3.9: Superposición de señales de triglicéridos (verde) y 1,3- diglicéridos (roja).

Por último, también existen otros fenómenos de solapamiento que pueden dificultar el análisis. Es posible que los satélites ^{13}C de las señales de los compuestos mayoritarios sean tan grandes como las señales de los compuestos minoritarios, favoreciendo la aparición de problemas de solapamiento. Tal ocurre, por ejemplo, en el caso de la señal de los protones >CHOR de los 1,2-diglicéridos, que son

parcialmente solapados por los satélites de las señales próximas de olefínicos y >CHOR de triglicéridos (Figura 3.10)

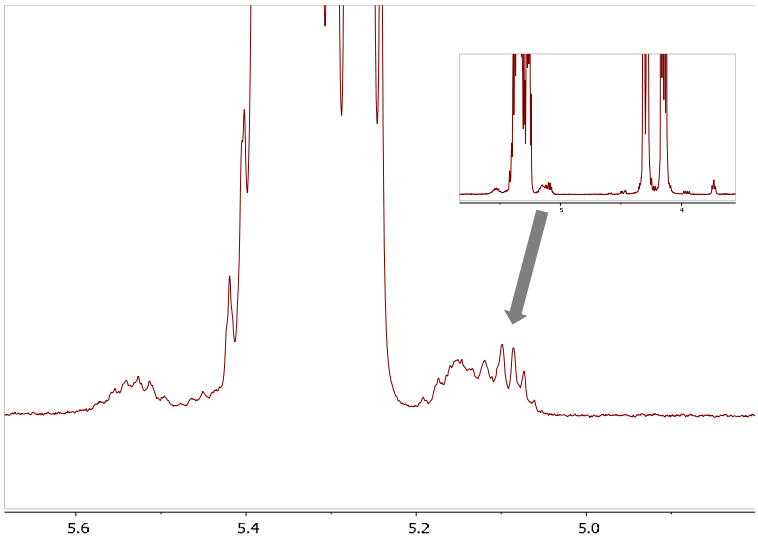


Figura 3.10: Señal de >CHOR de 1,2-DAG a 5.1 ppm parcialmente solapada por las señales satélite causadas por la señal mayoritaria adyacente.

Es un objetivo de este estudio tratar de resolver el problema de los solapamientos y mejorar la capacidad de análisis de grasas con RMN de 400 MHz. Para buscar soluciones se recurrió a varias estrategias ya empleadas en la bibliografía: utilización de secuencias de desacoplamiento (desacoplamiento de ^{13}C e irradiación selectiva de ^{1}H), adición de reactivos de desplazamiento y, por último, derivatización.

A continuación, se tratarán en detalle cada una de ellas.

3.7 DESACOPLAMIENTO DE SEÑALES EN RMN

Desacoplamiento de heteroátomos

En análisis de mezclas complejas, donde algunos de los analitos están presentes en muy baja concentración, puede ocurrir, como ya ha sido comentado, que las señales satélite de ^{13}C de los componentes más abundantes sean tan grandes como las señales minoritarias, obstaculizando su detección.

La abundancia natural del isótopo ^{13}C es del 1.1%. Se trata de un núcleo con spin ½ y por tanto se acopla con las resonancias de los protones adyacentes ($J_{H,C}$=100-200 Hz), produciendo dos señales a ambos lados de la señal principal (satélites) y con una intensidad del 0.55% de ésta. Estos satélites de carbono, debido a su relativamente pequeña intensidad, no suelen interferir significativamente con otras señales. Sin embargo, pueden suponer un problema cuando los satélites de las señales mayoritarias se solapan con las señales de los compuestos minoritarios. En este caso, es conveniente eliminar los satélites mediante secuencias de desacoplamiento de heteroátomos de banda ancha (*heteroatom broadband decoupling*).

El desacoplamiento se consigue irradiando en el rango de las frecuencias de carbono durante la adquisición del espectro de protón. Como resultado, la saturación de los carbonos impide su acoplamiento, y el resultado es un espectro de protón sin señales satélite. El espectro, así simplificado, facilita la identificación, aislamiento e integración de las señales, como puede verse en el ejemplo de la siguiente Figura 3.11:

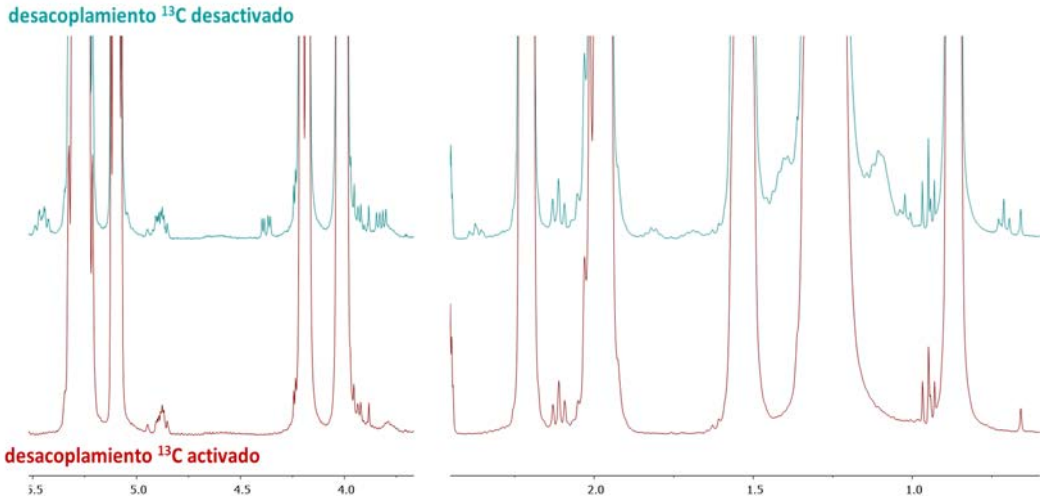


Figura 3.11: Mejora de resolución y simplificación del espectro mediante eliminación de señales satélite ^{13}C. En rojo, espectro con desacoplamiento de heteroátomo.

Desde el punto de vista operativo, el desacoplamiento se lleva a cabo mediante un esquema de pulsos compuestos discontinuos. No es conveniente aplicar pulsos continuos de desacoplamiento por el riesgo de calentar demasiado la muestra o dañar la sonda, ya que se requiere de niveles de potencia altos. Normalmente, en la práctica, se aplican esquemas de pulsos como el Waltz-16 (que es el que hemos incorporado a nuestros experimentos) o como el GARP. Ambos son esquemas de pulsos de tipo desacoplamiento inverso confinado (*inverse gated decoupling*) y pueden ser implementados de forma sencilla a partir del software del espectrómetro, donde ya aparecen configurados. En estos esquemas, sólo se aplica el pulso de desacoplamiento durante el tiempo justo de adquisición y así evitar el exceso de potencia (sobrecalentamiento), además de efectos Overhauser. Adicionalmente, el uso de tiempos altos de relajación (d1) dentro de estos esquemas introduce pausas más largas entre pulsos que favorecen que no se produzca este sobrecalentamiento.

Irradiación selectiva

Otra aproximación para simplificar el espectro y mejorar la discriminación de señales consiste en la aplicación de experimentos de irradiación selectiva con el fin de simplificar la multiplicidad de las señales.

Los acoplamientos entre protones causan multiplicidad (doblete, triplete, multiplete, etc.) y un correspondiente ensanchamiento de las señales. Podemos eliminar dicho acoplamiento irradiando selectivamente sobre la frecuencia del protón acoplado a la señal de interés. Como resultado de la irradiación, la señal se simplificará, pasando de triplete a singlete, por ejemplo.

A diferencia del caso anterior, donde irradiamos un núcleo (^{13}C) mientras observamos otro (^{1}H), en este caso se trata de un desacoplamiento homonuclear (*homonuclear decoupling*) ya que la irradiación y la observación se realizan sobre el mismo núcleo; el protón. Puesto que la frecuencia de desacoplamiento cae dentro del rango de la anchura espectral observada, sólo puede aplicarse irradiación desacoplante durante el tiempo intermedio entre muestreos (tiempo de permanencia o *dwell time*) o de lo contrario se saturaría el receptor, destruyendo el análisis.

En el caso particular de nuestras muestras de grasa, al irradiar en la frecuencia de los protones olefínicos (5.4 ppm) se consigue simplificar la multiplicidad de las señales de los protones bis-alílicos (2.8 ppm). Antes de la irradiación selectiva las señales tienen forma compleja de dos pseudotripletes solapados entre sí y tras la irradiación se distinguen 3 singletes que pueden analizarse por separado, permitiendo discriminar las señales correspondientes a los ácidos grasos di-insaturados (linoleico) de la de los tri-insaturados (linolénico) y del resto de polinsaturados (Figura 3.12). Puede observarse, que puesto que el pulso de irradiación afecta a los protones *sn*-2 del resto glicerol, la señal de los *sn*-1 y *sn*-3 también se simplifica.

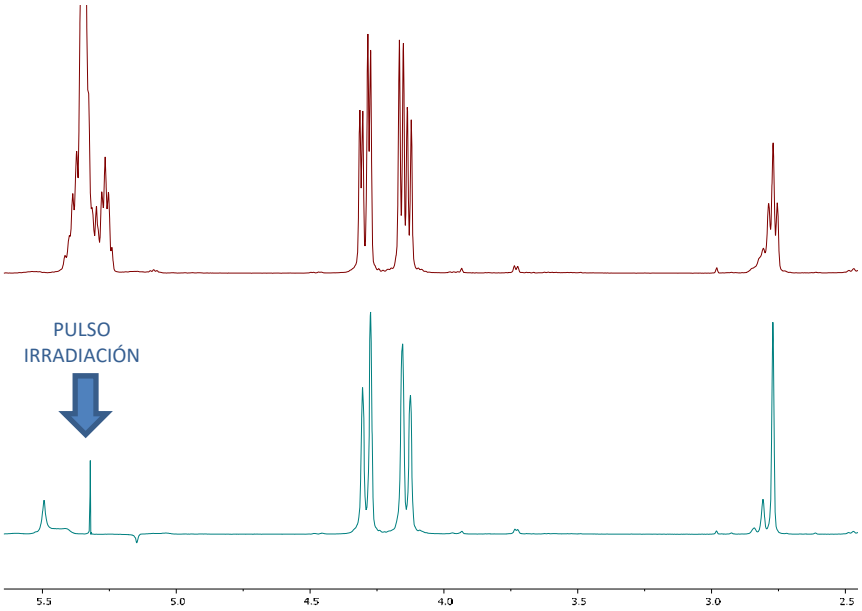


Figura 3.12: Efecto de la irradiación homonuclear selectiva en la simplificación de las señales a 2.8 ppm.

Queda demostrado el potencial de esta estrategia para lograr simplificar y mejorar la identificación y caracterización de sistemas de señales complejos y solapados. No obstante, trasladarla a usos de análisis cuantitativo es arriesgado, puesto que la irradiación tiene efectos sobre la intensidad del resto de señales, desvirtuando las medidas. Puede ser útil, sin embargo, en análisis que no requieran de excesiva exactitud o en los casos en los que cualquier otra aproximación no resuelva el problema; siempre que se asuma que los valores son aproximados.

3.8 REACTIVOS DE DESPLAZAMIENTO

Diferenciar entre grasas *cis* y *trans* en RMN es posible cuando se usan electroimanes de altas frecuencias de Larmor (600 MHz), pues las señales de ambos tipos de protones vinílicos se separan lo suficiente (Ej: ác. oleico (*cis*) 5.35 ppm, ác. eláidico (*trans*): 5.38 ppm). Sin embargo, en los equipos de 400 MHz la resolución no es suficiente y el solapamiento entre las señales *cis* y *trans* impide su

discriminación. Para solucionar este problema, aplicamos una estrategia basada en reactivos de desplazamiento de plata. Existe bibliografía[17] donde se describe cómo el uso de una sal de plata, en concreto AgFOD (2,2-dimetil-6,6,7,7,8,8,8-heptafluoro-3,5-octanodionato de plata (I)) logra una separación suficiente de las señales incluso en un RMN de 300 MHz. En la siguiente figura, se aprecia el resultado de aplicar esta estrategia sobre el extracto lipídico de mantequilla. Puede apreciarse cómo se separan las señales tanto de los protones vinílicos como de los alílicos, permitiendo la integración por separado de las grasas *cis* y *trans* (Figura 3.13).

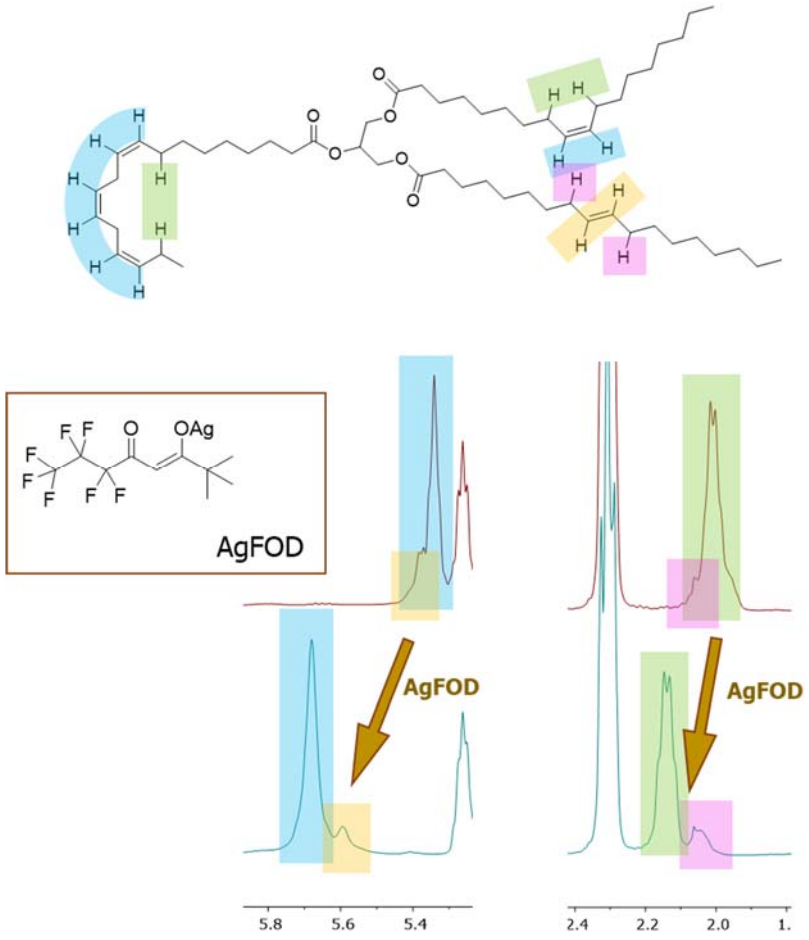


Figura 3.13: Desplazamiento de la señal de protones vinílicos y alílicos tras adición de reactivo de desplazamiento.

3.9 DERIVATIZACIÓN

La estrategia de derivatización viene a salvar el problema de detección de los 1,3-diacilgliceroles, cuya señal (minoritaria) queda sepultada por la señal mayoritaria de los triglicéridos.

Consiste en el uso de reactivos capaces de unirse a nuestra molécula objetivo y que incluyen, en su estructura, átomos de fósforo o de flúor que permitirán que podamos detectar al compuesto formado utilizando espectroscopia ^{31}P-RMN o ^{19}F-RMN, donde, al contrario que con ^{1}H-RMN, no existirán los solapamientos que nos imposibilitaban su cuantificación. Los reactivos de derivatización útiles para nuestro propósito son cloruros de ácido capaces de reaccionar de forma rápida y cuantitativa con los grupos hidroxilo libres presentes en los mono- y diglicéridos.

En el caso de la derivatización con ^{31}P, el reactivo 2-cloro-4,4,5,5-tetrametildioxafosfolano reacciona con los grupos hidroxilo libres de los mono- y digliceroles para formar nuevos derivados que incluyen un átomo de fósforo que puede ser diferenciado mediante espectroscopia ^{31}P-RMN. Este procedimiento ha sido descrito por Dais, P. y colaboradores[18] anteriormente. La reacción de derivatización tiene lugar dentro del tubo del RMN mediante un procedimiento sencillo y fue llevada a cabo para el análisis de muestras de embutido (Figura 3.14).

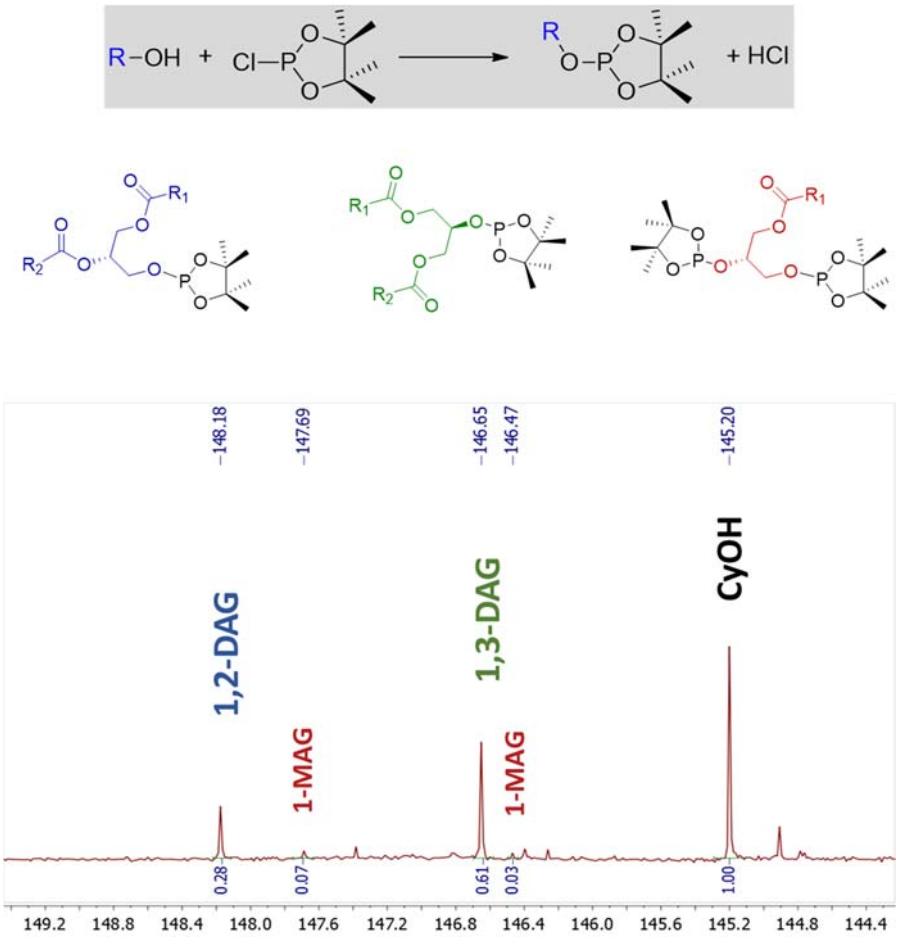


Figura 3.14: Espectro ^{31}P-RMN de grasa de embutido tras derivatización.

Con esta técnica, la cuantificación de los diglicéridos y monoglicéridos puede llevarse a cabo comparando el valor de integración de cada una de las señales frente al de un patrón interno. El patrón recomendado por el método es el ciclohexanol (CyOH), que es añadido al tubo de muestra en cantidad conocida y reacciona con al reactivo de derivatización, al igual que los hidroxilos libres de nuestras moléculas de interés.

En el caso de derivatización con reactivos de ^{19}F, se ha seguido el procedimiento propuesto por Zhou.[19] En este caso, el reactivo que se une a los hidroxilos libres es

el cloruro de 4-fluorobenzoilo. La señal de flúor tiene forma de multiplete debido al acoplamiento con los cuatro protones del ciclo. Se realizó la derivatización de muestras de extracto lipídico de embutido directamente dentro del tubo de análisis y se realizaron los espectros. En la siguiente figura (Figura 3.15) pueden verse, junto a la señal del patrón interno (*terc*-butanol), las señales que originan los 1,2 y 1,3-diglicéridos.

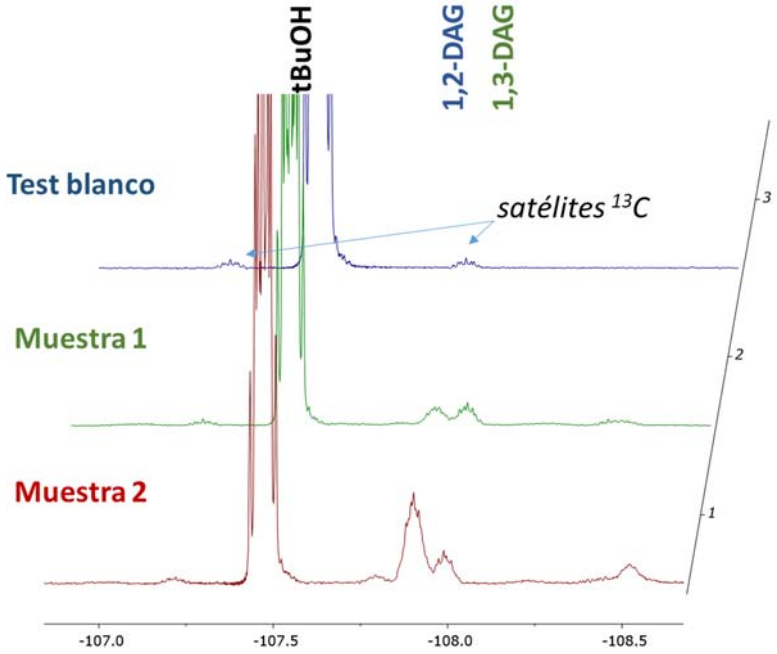


Figura 3.15: Espectros ^{19}F del reactivo de derivatización y de dos diferentes muestras derivatizadas.

Como alternativa para simplificar el espectro también se realizaron espectros de ^{19}F-RMN desacoplados de ^{1}H para lograr señales más sencillas y estrechas (Figura 3.16).

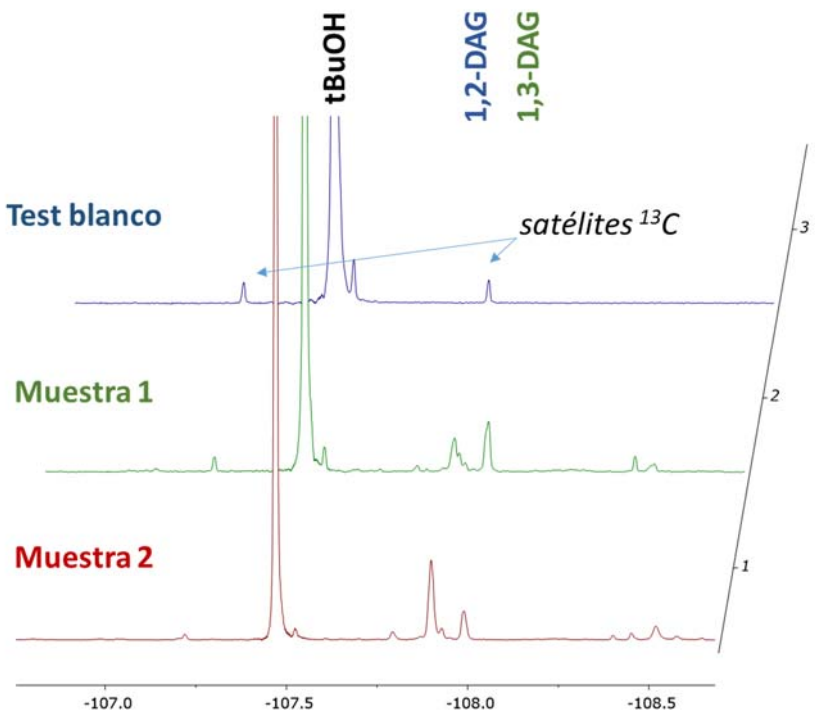


Figura 3.16: Espectros ^{19}F (desacoplado de ^{1}H) del reactivo de derivatización y de dos diferentes muestras derivatizadas.

El procedimiento de análisis desacoplado de ^{1}H presenta un espectro más sencillo y fácil de integrar. Sin embargo, en ambos casos, la señal de un satélite ^{13}C proveniente de la señal del patrón interno coincide justamente con la señal de los 1,3-diacilgliceroles, desvirtuando su valor, lo que aconseja adecuar el procedimiento propuesto por Zhou, bien modificando la sustancia de referencia interna o bien optimizando un experimento de ^{19}F desacoplado de ^{13}C.

En un intento de simplificar el espectro, fue probado también un reactivo de derivatización similar al anterior pero que no aportara el inconveniente de los multipletes. Se trata del cloruro de 4-trifluorometilbenzoilo. Las pruebas con este reactivo no ofrecieron buenos resultados pues la señal de flúor de los diferentes compuestos es muy similar y origina un espectro repleto de solapamientos.

3.10 INTERPRETACIÓN DEL ESPECTRO

En un espectro típico de extracto lipídico de embutido pueden identificarse las siguientes señales propias de las cadenas acílicas de los ácidos grasos (Figura 3.17):

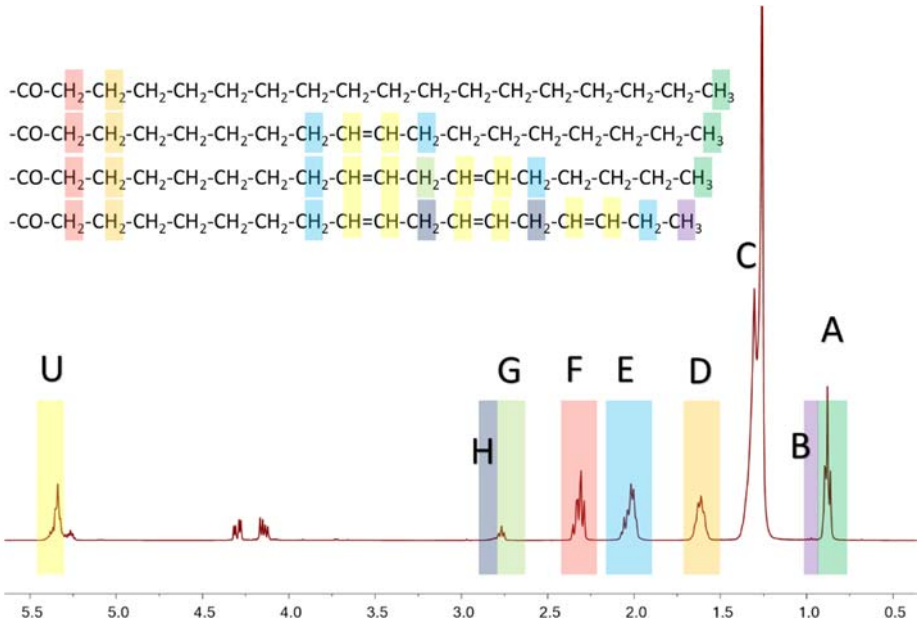


Figura 3.17: Espectro de ^{1}H-RMN de grasa de embutido y correspondencia de señales.

Pueden distinguirse diferentes tipos de protones en función de su correspondiente posición en la cadena. Los grupos metilo terminales generan el psudotriplete **A**, excepto los metilos de cadenas omega-3, que generan la señal **B**.

Los protones unidos al carbono 2 (C2), contiguo al carboxilo, aparecen como señal **F**, mientras que los protones en C3 se agrupan en la señal **D**.

Los protones alílicos, aquellos que están en posición contigua a un único doble enlace, forman la señal **E**. Los protones bisalílicos, que están en posición contigua a dos dobles enlaces, generan las señales **G** (en el caso de di-insaturados, linoleico) y **H** (tri-insaturados, linolénico).

La señal **C** es la más grande del espectro y agrupa todos los metilenos restantes.

Por último, la señal **U** está formada por los protones olefínicos de los dobles enlaces.

La relación entre las señales **E** y **F** puede usarse para calcular las proporciones de restos acilo saturados (s) e insaturados (u), de acuerdo a las siguientes fórmulas:

$$\%u = 100 \times (\mathbf{E} / 2\mathbf{F})$$

$$\%s = 100 \times (1 - (\%u))$$

Para muchos alimentos, como los de origen vegetal, las cadenas acílicas poliinsaturadas están formadas en un 95% por sólo dos tipos de ácidos grasos: linoleico (omega-6) y linolénico (omega-3). En la grasa de embutidos también se cumple esta premisa, ya que los cerdos son animales monogástricos e incorporan a su metabolismo la grasa de la dieta, sin apenas modificación.

Esta singularidad simplifica bastante el análisis y permite acceder a la estimación de la composición a partir de la relación entre señales. Del espectro pueden deducirse los valores de linolénico (ln), linoleico (l) y monoinsaturados (m):

$$\%ln = 100 \times (\mathbf{B} / (\mathbf{A} + \mathbf{B}))$$

$$\%l = 100 \times (\mathbf{G} / \mathbf{F}) \qquad \text{(si la señal } \mathbf{G} \text{ puede integrarse por separado)}$$

$$\%l = 100 \times (((\mathbf{G} + \mathbf{H}) / \mathbf{F})) - 2 \times (\%ln) \qquad \text{(cuando las señales } \mathbf{G} \text{ y } \mathbf{H} \text{ se solapan)}$$

$$\%m = (\%u) - (\%l) - (\%ln)$$

Estas fórmulas no pueden aplicarse en alimentos como, por ejemplo, el pescado, puesto que contienen cantidades significativas de DHA o EPA y la exclusividad linoleico/linolénico ya no se cumple. El desplazamiento químico de los protones en C2 y C3 del DHA generan una señal independiente ($\mathbf{F_1}$) que puede ser integrada por separado de la señal **F** mayoritaria de los C2. Similarmente, los protones en C3 de ARA y EPA originan una señal ($\mathbf{D_1}$) distinguible de **D**. Esta características permite cuantificar estos ácidos grasos esenciales de acuerdo a las siguientes fórmulas:[20]

$$\%(EPA + ARA) = 100 \times (\mathbf{D_1} / (\mathbf{D} + \mathbf{D_1}))$$

$$\%DHA = 100 \times (\mathbf{F_1} / (2\mathbf{F} + \mathbf{F_1}))$$

$$\%u = 100 \times (2\mathbf{E} / (4\mathbf{F} + \mathbf{F_1}))$$

$$\%\ n\text{-}3 = 100 \times (\mathbf{B} / (\mathbf{A} + \mathbf{B}))$$

Para la cuantificación de los metabolitos de lipólisis (mono y diglicéridos) se requiere de un experimento adicional de derivatización, puesto que la señal de los 1,3-diglicéridos no puede ser integrada por separado. La combinación de los dos experimentos de RMN, antes y después de derivatizar, nos aporta abundante información, tanto en el plano de los componentes mayoritarios como en lo referente a los metabolitos de lipólisis.

Si bien la metodología presente es suficiente para abordar el estudio de las grasas y su evolución, el hecho de requerir de un doble experimento la convierte en menos útil y aplicable. Por ello, nuestra investigación se centró en explorar alternativas que permitieran la simplificación del procedimiento.

3.11 CONCLUSIONES

Diversas optimizaciones han sido aplicadas para lograr solucionar los diferentes problemas de sensibilidad o solapamiento. En resumen, se ha optimizado una metodología de extracción y una preparación de muestra acorde con los objetivos. La utilización de programas de pulsos con ns = 64 y tiempos de d1 suficientes (10 s), que incluyen secuencias de desacoplamiento de satélites de carbono (Waltz-16), permiten la obtención de espectros de RMN optimizados para el análisis cuantitativo, donde se incrementa notoriamente la sensibilidad (relación señal-ruido), se consiguen señales con intensidades proporcionadas y se simplifica el espectro, eliminando algunos solapamientos con señales minoritarias. El solapamiento que oculta la señal de los 1,3-DAG puede resolverse realizando un segundo experimento, aplicando reactivos de derivatización de fósforo, que permite la fácil cuantificación de los metabolitos minoritarios de lipólisis.

3.12 BIBLIOGRAFÍA

(1) Soxhlet, F. Die Gewichtsanalytische Bestimmung Des Milchfettes. *Dingler's Polytech. J.* **1879**, *232*, 461.

(2) Folch, J.; Lees, M.; Sloane Stanley, G. H. A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipides from Animal Tissues. *J. Biol. Chem.* **1957**, *226* (1), 497–509.

(3) Bligh, E. G.; Dyer, W. J. A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **1959**, *37* (8), 911–917.

(4) Hara, A.; Radin, N. S. Lipid Extraction of Tissues with a Low-Toxicity Solvent. *Anal. Biochem.* **1978**, *90* (1), 420–426.

(5) Matyash, V.; Liebisch, G.; Kurzchalia, T. V; Shevchenko, A.; Schwudke, D. Lipid Extraction by Methyl-Tert-Butyl Ether for High-Throughput Lipidomics. *J. Lipid Res.* **2008**, *49* (5), 1137–1146.

(6) Ganzler, K.; Salgó, A.; Valkó, K. Microwave Extraction : A Novel Sample Preparation Method for Chromatography. *J. Chromatogr. A* **1986**, *371*, 299–306.

(7) Richter, B. E.; Richter, B. E.; Jones, B. A.; Jones, B. A.; Ezzell, J. L.; Ezzell, J. L.; Porter, N. L.; Porter, N. L.; Avdalovic, N.; Lake, S.; et al. Accelerated Solvent Extraction: A Technique for Sample Preparation. *Anal. Chem.* **1996**, *68* (6), 1033–1039.

(8) Hartmann, A.; Ganzera, M. Supercritical Fluid Chromatography – Theoretical Background and Applications on Natural Products. *Planta Med.* **2015**, *81* (17), 1570–1581.

(9) Ruiz-Jiménez, J.; Luque de Castro, M. . Forward-and-Back Dynamic Ultrasound-Assisted Extraction of Fat from Bakery Products. *Anal. Chim. Acta* **2004**, *502* (1), 75–82.

(10) Siciliano, C.; Belsito, E.; De Marco, R.; Luisa Di Gioia, M.; Leggio, A.; Liguori, A. Quantitative Determination of Fatty Acid Chain Composition in Pork Meat Products by High Resolution ^{1}H NMR Spectroscopy. *Food Chem.* **2013**, *136*, 546–554.

(11) Aguirrezábal, M. M.; Mateo, J.; Domínguez, M. C.; Zumalacárregui, J. M. The Effect of Paprika, Garlic and Salt on Rancidity in Dry Sausages. *Meat Sci.* **2000**, *54* (1), 77–81.

(12) Prema, D.; Turner, T. D.; Jensen, J.; Pilfold, J. L.; Church, J. S.; Donkor, K. K.; Cinel, B. Rapid Determination of Total Conjugated Linoleic Acid Concentrations in Beef by ^{1}H NMR Spectroscopy. *J. Food Compos. Anal.* **2015**, *41*, 54–57.

(13) Nieva-Echevarría, B.; Goicoechea, E.; Manzanos, M. J.; Guillén, M. D. The Influence of Frying Technique, Cooking Oil and Fish Species on the Changes Occurring in Fish Lipids and Oil during Shallow-Frying, Studied by ^{1}H NMR. *Food Res. Int.* **2016**, *84*, 150–159.

(14) Dherbé Court, J.; Bourlieu, C.; Maillard, M.; Aubert-frogerais, L.; Richoux, R.; Thierry, A. Time Course and Specificity of Lipolysis in Swiss Cheese. *J. Agric. Food Chem* **2010**, *58*, 11732–11739.

(15) Guillén, M. D.; Ruiz, A. Edible Oils: Discrimination by ^{1}H Nuclear Magnetic Resonance. *J. Sci. Food Agric.* **2003**, *83* (4), 338–346.

(16) Sacchi, R.; Mannina, L.; Fiordiponti, P.; Barone, P.; Paolillo, L.; Patumi, M.; Segre, A. Characterization of Italian Extra Virgin Olive Oils Using ^{1}H-NMR Spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46* (10), 3947–3951.

(17) Agiomyrgianaki, A.; Sedman, J.; Van de Voort, F. R.; Dais, P. Cis and Trans Components of Lipids: Analysis by ^{1}H NMR and Silver Shift Reagents. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2012**, *114* (5), 504–509.

(18) Spyros, A.; Dais, P. Application of ^{31}P NMR Spectroscopy in Food Analysis. 1. Quantitative Determination of the Mono- and Diglyceride Composition of Olive Oils. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48* (3), 802–805.

(19) Zhou, L. L.; Li, C.; Weng, X. C.; Fang, X. M.; Gu, Z. H. ^{19}F NMR Method for the Determination of Quality of Virgin Olive Oil ; Método ^{19}F RMN Para Determinar La Calidad Del Aceite de Oliva Virgen. **2009**, *67* (1), 468–474.

(20) Vidal, N. P.; Manzanos, M. J.; Goicoechea, E.; Guillén, M. D. Quality of Farmed and Wild Sea Bass Lipids Studied by ^{1}H NMR: Usefulness of This Technique for Differentiation on a Qualitative and a Quantitative Basis. *Food Chem.* **2012**, *135* (3), 1583–1591.

CAPÍTULO 4
ESTRATEGIAS DE ANÁLISIS ALTERNATIVAS

Contenido

4.1 EL DESPLAZAMIENTO QUÍMICO 109
4.2 EFECTO DE LA TEMPERATURA 111
4.3 EFECTO DEL DISOLVENTE 112
4.4 APLICACIÓN AL ANÁLISIS 128
4.5 CONCLUSIONES 137
4.6 BIBLIOGRAFÍA 138

"El verdadero viaje del aprendizaje consiste no en buscar
nuevos paisajes sino en mirar con nuevos ojos"

Marcel Proust

4.1 EL DESPLAZAMIENTO QUÍMICO

La principal desventaja de la espectroscopia de ^{1}H-RMN es, sin duda, la coincidencia en desplazamiento químico de muchas señales que provoca solapamientos y que dificulta la caracterización. La solución más evidente consiste en utilizar equipos con campos magnéticos más potentes para obtener mayor resolución que permita tener señales más estrechas que no se superpongan, pero no es una solución al alcance de la mano de muchos laboratorios de instituciones académicas, centros tecnológicos o empresas ya que los equipos son muy costosos. Nuestro trabajo ha consistido en ensayar otras estrategias alternativas que no implicasen campos más altos, es decir, tratar de exprimir el potencial de los equipamientos más asequibles.

Para ello, es necesario incidir en la naturaleza y las causas del desplazamiento químico. En esta línea, estrategias capaces de modular a conveniencia el valor del desplazamiento químico de las señales de interés podrían ser de gran utilidad para resolver los problemas de solapamiento.

El desplazamiento químico está relacionado con la frecuencia de resonancia de cada núcleo concreto. Esta frecuencia de resonancia no es idéntica para todos los núcleos presentes en la muestra porque no depende exclusivamente del campo magnético externo aplicado (que es común para todos) sino también del campo local que experimenta cada núcleo. Ahí entra en juego la naturaleza química y los orbitales electrónicos que rodean dicho núcleo. Los factores estructurales inducen cambios en el campo magnético al que está realmente expuesto el núcleo, lo cual afecta a la frecuencia de resonancia y es, en definitiva, la causa última de que diferentes núcleos tengan diferente desplazamiento químicos. Estas diferencias entre núcleos están íntimamente vinculadas a la estructura, y son el fundamento que hace que la RMN sea tan útil en elucidación estructural.

Los factores que afectan al desplazamiento químico son variados. En primer lugar, los electrones que rodean al núcleo crean un campo magnético que se opone al campo externo aplicado. Esto provoca que el núcleo experimente un campo reducido y es por ello que se dice que los electrones **apantallan** al núcleo. La presencia de grupos electronegativos próximos retira parte de la densidad electrónica causando un efecto de desapantallamiento, que se traduce en desplazamientos químicos más altos. Este fenómeno se conoce como efecto inductivo por grupos electronegativos. El efecto es acumulativo (cuantos más grupos electronegativos próximos, mayores desplazamientos químicos) y no afecta únicamente a los núcleos inmediatamente próximos, sino que se extiende a lo largo de la cadena; si bien se disipa progresivamente al alejarnos del grupo electronegativo.

El desplazamiento químico también se ve afectado por la anisotropía magnética. El campo magnético externo induce en los electrones de tipo π (aromáticos, alquenos, alquinos, carbonilos, etc.) un campo magnético anisotrópico en una orientación que puede ser diferente a la dirección del campo externo y del campo generado por los electrones de valencia. Como resultado, el núcleo se ve afectado por tres campos a la vez: el campo aplicado, el campo de los electrones y el campo anisotrópico. Dependiendo de la posición del protón respecto al campo anisotrópico podrá verse apantallado o desapantallado.

Asimismo, el desapantallamiento de los protones involucrados en enlaces de hidrógeno es relativamente variable, pues se ve influenciado por factores como solvatación, pH, concentración y temperatura.

En relación al efecto de la temperatura,[1,2] el desplazamiento químico es un parámetro dependiente de la conformación de la molécula. En disolución, varias conformaciones de una misma sustancia pueden coexistir y éstas pueden estar presentes en diferentes porcentajes en función de sus energías. Habitualmente, existe un intercambio rápido de conformaciones y el desplazamiento químico observado es el promedio ponderado de todas las conformaciones presentes. Al modificar la temperatura se favorece la probabilidad de ciertas conformaciones en detrimento de las otras, y como resultado el desplazamiento químico observado (promedio) podría variar.

Por último, es conveniente recordar el papel que desempeña el disolvente deuterado. Existen cuatro tipos de interacciones[3] entre el disolvente y la muestra que pueden afectar al desplazamiento químico: enlaces de hidrógeno, anisotropía, polaridad y fuerzas de Van der Waals. El disolvente más generalizado, gracias a que es muy inerte, buen disolvente y relativamente barato es el cloroformo deuterado ($CDCl_3$). Su uso es muy común y está implícitamente aceptado como estándar. No obstante, existen otros disolventes deuterados alternativos como el benceno-d6, la acetona-d6 o el dimetilsulfóxido-d6, por poner algunos ejemplos. Todos estos disolventes presentan electrones de tipo π y polaridades diferentes al $CDCl_3$, así que es esperable que puedan provocar efectos de apantallamiento o desapantallamiento distintos. Asimismo, a causa de su diferente polaridad también tendrán diferentes efectos sobre los enlaces de hidrógeno.

4.2 EFECTO DE LA TEMPERATURA

Para comprobar si la temperatura tiene algún efecto en el desplazamiento químico de las señales en las muestras de grasa se llevó a cabo un experimento en el que se registraron espectros de una misma muestra a lo largo de un intervalo de temperaturas comprendido entre 23 y 50 °C. En la Figura 4.1 se representan apilados, de abajo a arriba, los espectros a 23, 25, 30, 35, 40, 45 y 50 °C. No se aprecia ningún efecto sobre el desplazamiento de las señales en este intervalo de temperaturas. Plantear el uso de temperaturas más altas o bajas que las ya ensayadas añadiría bastante complejidad operativa al experimento y sería poco apropiado con vistas a ser implementado como un procedimiento de rutina. Se decidió, por tanto, investigar si otros factores como la naturaleza del disolvente generan resultados más favorables.

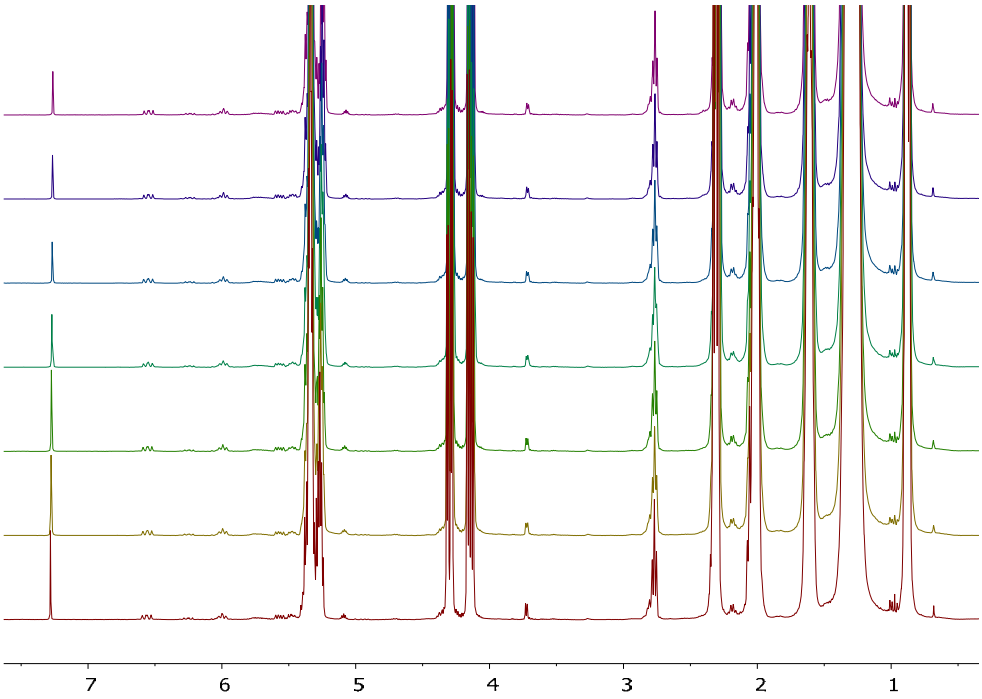


Figura 4.1: Superposición de espectros a diferentes temperaturas 23, 25, 30, 35, 40, 45 y 50º C.

4.3 EFECTO DEL DISOLVENTE

Se probaron disolventes deuterados diferentes de $CDCl_3$ para comprobar si el efecto del disolvente sobre los desplazamientos químicos puede aportar ventajas en forma de una mayor separación de señales. Para comprobar la validez de los disolventes se utilizó como muestra de referencia un extracto lipídico con alto grado de lipólisis; capaz de aportar la práctica totalidad de las señales esperables en nuestros análisis.

4.3.1. Benceno-d6

El benceno hexadeuterado (C_6D_6) es un disolvente aromático y su densidad electrónica π puede ser útil a la hora de obtener diferentes desplazamientos químicos. Se llevó a cabo un análisis de extracto lipídico en condiciones similares a

las presentadas hasta ahora, pero sustituyendo el cloroformo por benceno deuterado. Tal y como se podía prever, prácticamente todas las señales presentes en el espectro vieron modificado su δ en mayor o menor medida. (Figura 4.2)

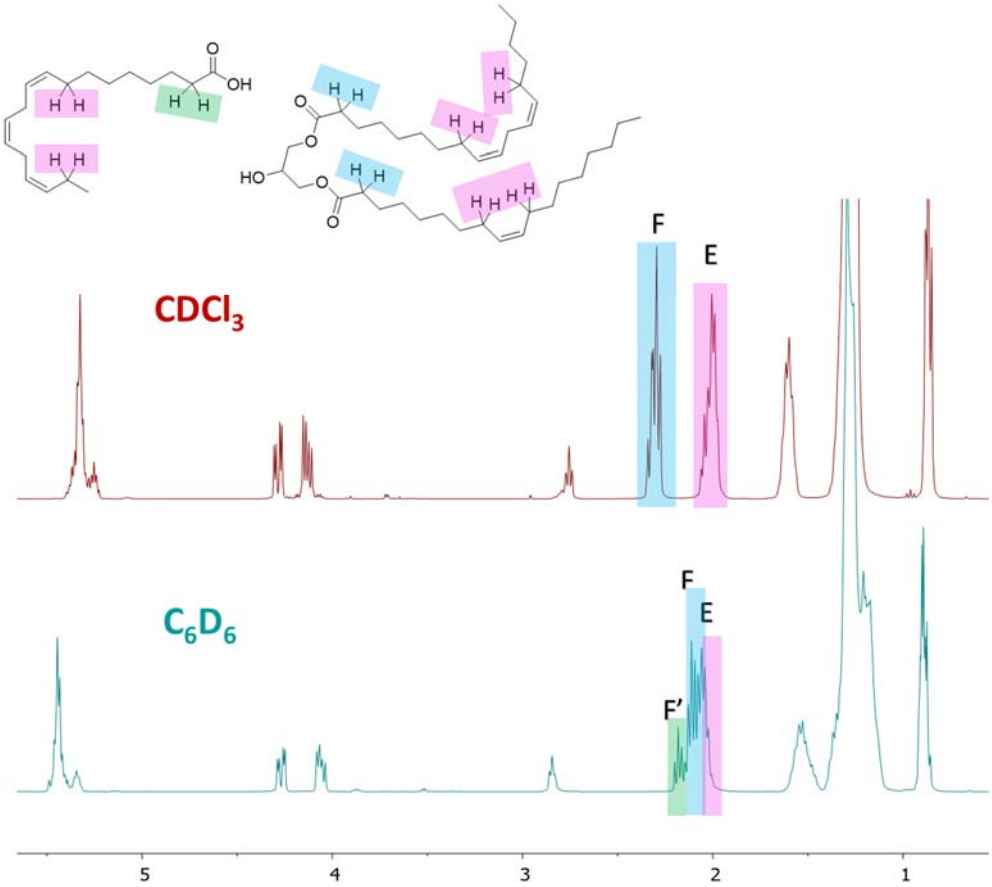


Figura 4.2: Comparativa de espectros en $CDCl_3$ (superior)y C_6D_6 (inferior).

El resultado es interesante, pues aparecen efectos dispares, de los cuales algunos aportan ventajas y otros no. En primer lugar, como resultado más destacable, la señal **F** de los protones en el carbono C1 en α de carbonilo y la señal **E** de protones alílicos se solapan completamente, imposibilitando su integración por separado. En apariencia es la mezcla de tres señales, pues puede distinguirse una señal que asemeja la fusión del pseudotriplete **F** y el multiplete **E**, pero también aparece, a campo más bajo, otro pseudotriplete **F'** parcialmente solapado, que

posteriormente pudo comprobarse que se correspondía con la señal de los protones en C1 de los ácidos grasos libres. Esta señal propia de los ácidos grasos libres presenta un desplazamiento químico ligeramente diferente también en $CDCl_3$, aunque el solapamiento es tan intenso que dificulta su detección. A pesar de ello, esta pequeña diferencia de desplazamiento ha sido utilizada con éxito en la monitorización del proceso de esterificación de ácidos grasos en la fabricación de combustible biodiesel.[4]

También, como desventaja adicional, las señales de los bisalílicos (**G** y **H**), que en cloroformo son parcialmente distinguibles, en benceno se solapan totalmente. (Figura 4.3)

En el lado opuesto, obtenemos ventajas para algunas de las señales. La señal **M** del protón *sn*-2 de los 1,3-DAG ya no se solapa con la señal mayoritaria de los TAG, lo cual es muy interesante, pues abre la oportunidad de poder prescindir de las derivatizaciones. También, como punto favorable, la señal del protón *sn*-2 de TAG (**T**) ahora se solapa menos con la señal de olefínicos (**U**). (Figura 4.3)

Haciendo balance, al margen de la pérdida de información referente a las señales **E** y **F**, el efecto sobre las señales de los compuestos minoritarios de lipólisis, DAG y MAG es relativamente favorable. Usando benceno-d6 disponemos de, al menos, una señal sin solapamientos para cada tipo de compuestos derivados de glicerilo. Para los 1,2-DAG es útil la señal **S** a 5.15 ppm, ya que la señal **K** a 3.46 se solapa parcialmente con los 1-MAG. Para los 1,3-DAG contamos ahora con la señal **M** a 3.82, que ya no se solapa con las señales de los TAG. Para los 1-MAG podemos optar por la señal **L** a 3.71 y para los 2-MAG con la **R** de 4.88 ppm. En la siguiente figura se compara el espectro del extracto lipídico con los respectivos patrones de DAG y MAG. (Figura 4.4)

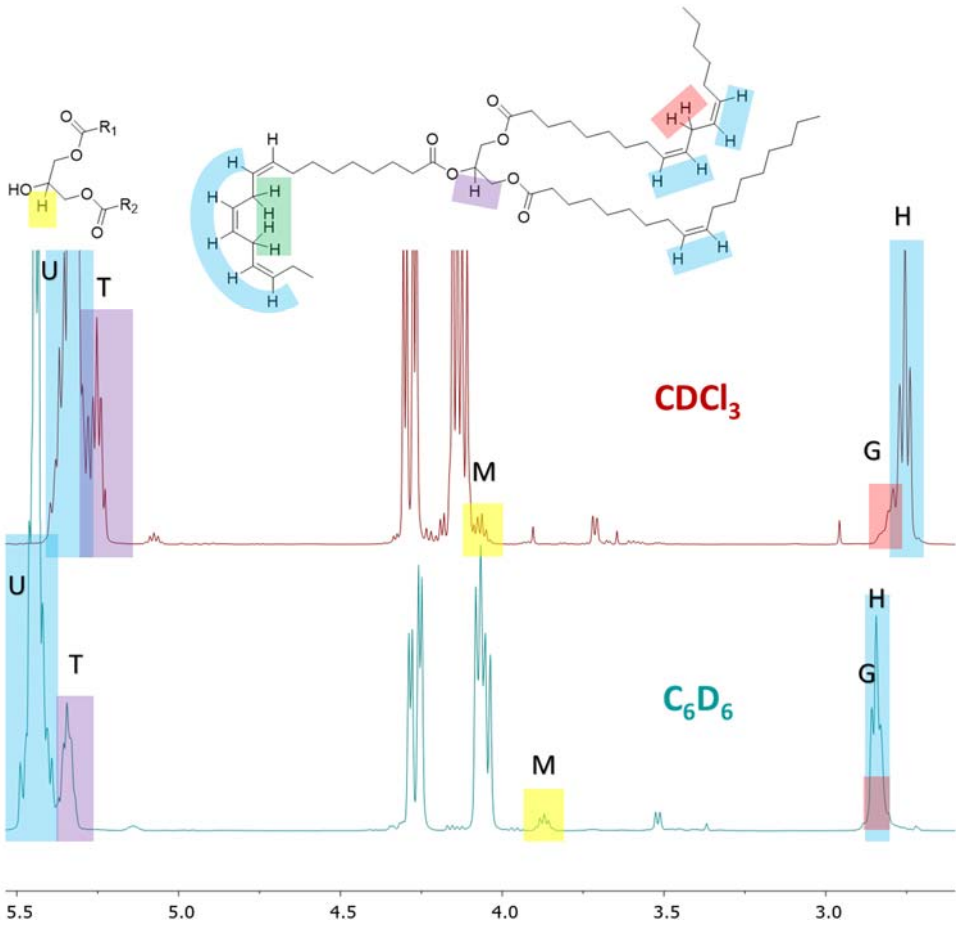


Figura 4.3: Comparativa de espectros en $CDCl_3$ (superior) y C_6D_6 (inferior).

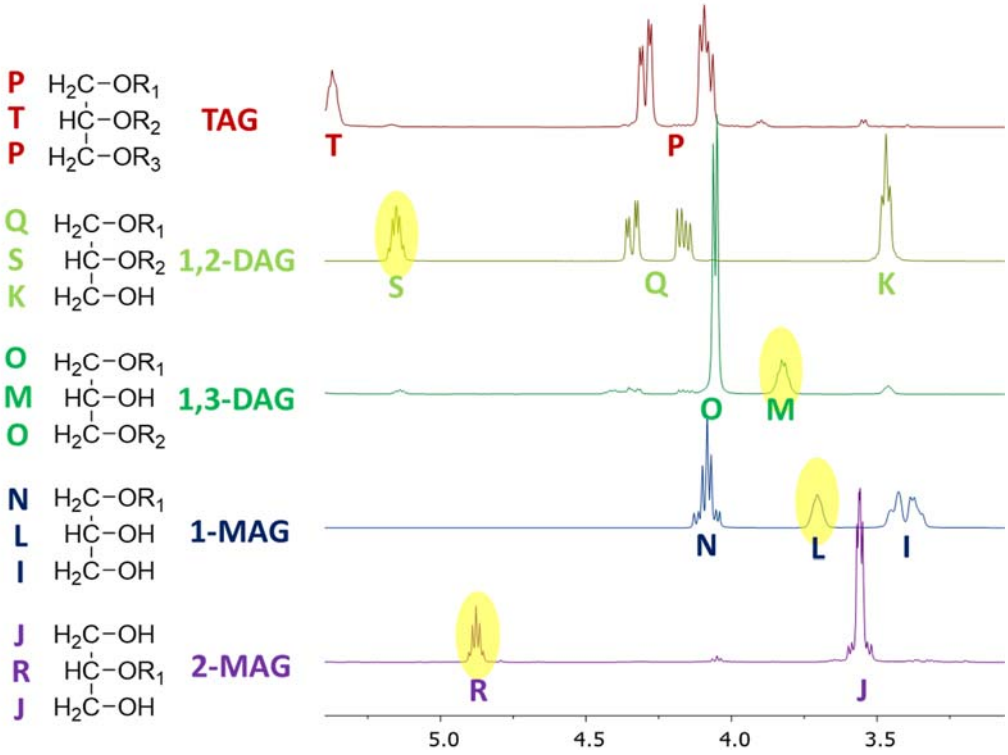


Figura 4.4: Señales características en C_6D_6 de los patrones de di-y monoacilgliceroles comparadas con el espectro del extracto lipídico.

4.3.2. Acetona-d6

Otro disolvente deuterado que puede resultar útil a nuestro propósito es la acetona hexadeuterada $(CD_3)_2CO$. De manera análoga a como se hizo con el benceno, se llevó a cabo un experimento de análisis de extracto lipídico usando este disolvente.

Una vez más se obtuvieron tanto efectos favorables como desfavorables. Con acetona no hay grandes cambios en los desplazamientos de las señales mayoritarias (Figura 4.5).

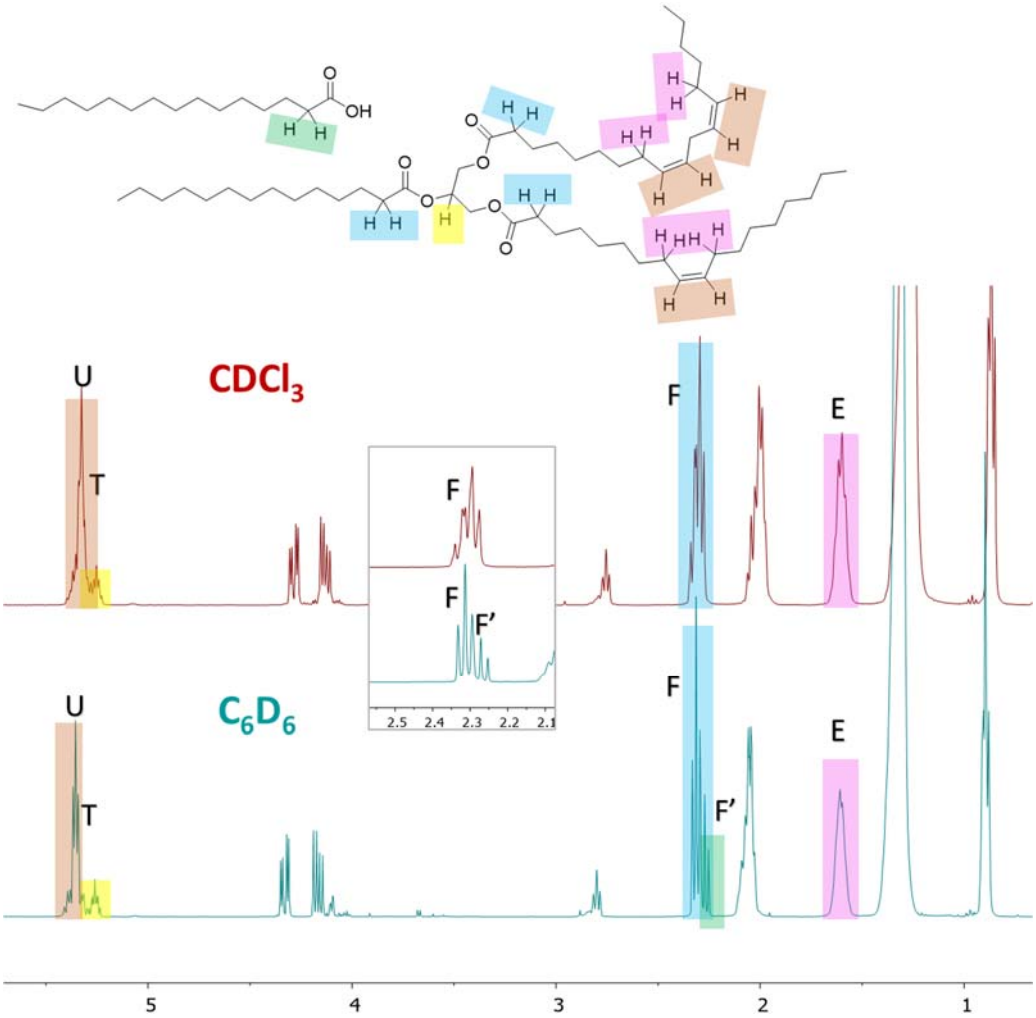


Figura 4.5: Comparativa de espectros en $CDCl_3$ (superior)y $(CD_3)_2CO$ (inferior).

Tan sólo anotar que en la señal **F** se aprecia un cierto desdoblamiento y las señales **F'**, propias de los ácidos grasos libres, aparecen ahora algo menos solapadas. Asimismo, las señales **U** y **T**, correspondientes a los olefínicos y los *sn*-2 de TAG, ahora también se separan mejor. Hay un claro inconveniente, sin embargo, y es que la señal residual del disolvente queda dentro de la señal **E** y desvirtúa su valor. Ello supone un problema, pues afecta a los cálculos de porcentajes de grasa insaturada, que dependen del valor de la señal **E**.

Respecto a las señales de los metabolitos de la lipólisis, una vez más se logra un gran cambio en el desplazamiento químico de las dos señales de los 1,3-DAG, las cuales dejan de estar solapadas con las señales de TAG. Desafortunadamente, ahora coinciden con una de las señales de los 1-MAG, aunque ello no imposibilita la cuantificación, que puede ser estimada mediante la diferencia. El contenido en 1-MAG puede ser calculado a partir de la integración de la señal **I** a 3.54 ppm; así que, posteriormente, tan sólo bastaría con restar ese valor (que equivale al valor de la señal **N**) a la integral de las dos señales **O** y **M** de 1,3-DAG, que en esta ocasión deben ser integradas, preferiblemente, juntas. Para el resto de metabolitos, los 1,2-DAG pueden ser calculados con la señal **S** a 5,07 y los 2-MAG con la señal **R** de 4,86 ppm. (Figura 4.6)

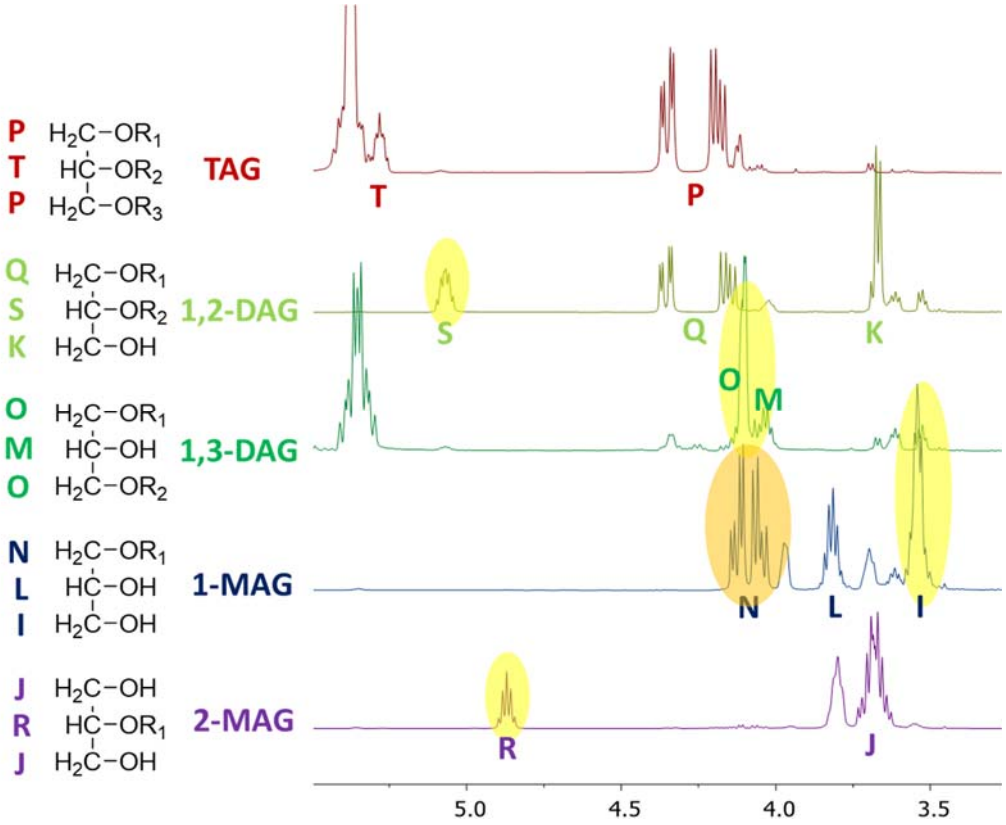


Figura 4.6: Señales características de los patrones de di-y monoacilgliceroles en $(CD_3)_2CO$.

4.3.3. Dimetilsulfóxido-d6

A la vista de los resultados precedentes, la utilización de diferentes disolventes deuterados parece ser de gran utilidad a la hora de modificar los desplazamientos químicos y lograr simplificar solapamientos indeseados. Desafortunadamente, ninguno de los dos disolventes ensayados hasta ahora, acetona-d6 y benceno-d6, aportan una solución integral a los problemas de solapamiento en nuestras muestras. Han demostrado ser útiles en la cuantificación de los 1,3-DAG, pero, sin embargo, fallan en otros aspectos, principalmente en lo referente a la señal **E** (protones alílicos), que, no olvidemos, es una señal necesaria para poder calcular los porcentajes de grasa insaturada en la muestra.

El dimetilsulfóxido-d6 $(CD_3)_2SO$) ó DMSO-d6 es un disolvente deuterado que se usa como alternativa al $CDCl_3$ cuando se requiere de disolventes más polares. A diferencia de los ejemplos anteriores, las muestras grasas presentan problemas de solubilidad en DMSO-d6, por lo que su utilización en nuestros experimentos se ve limitada. No es útil como disolvente único, pero existe la posibilidad de usarlo como mezcla, en combinación con otros disolventes. Existen antecedentes en el uso de mezclas cloroformo-dimetilsulfóxido. Así, por ejemplo, Sacchi y col.[5] utilizan una pequeña cantidad de DMSO-d6 como codisolvente para facilitar la solubilidad de los componentes más polares del aceite. El protocolo de preparación de muestra, en este caso, propone una muestra de 20 μL de aceite disuelta en una mezcla de $CDCl_3$ (700 μL) y DMSO-d6 (20 μL). Pese a que la cantidad de DMSO-d6 presente es pequeña, puede observarse que los desplazamientos químicos sufren una ligera variación. Por otro lado, Skiera y col.[6] utilizaron mezclas de $CDCl_3$/DMSO-d6 con el fin de detectar mejor la señal de los protones carboxílicos de los ácidos grasos libres. En cloroformo, los protones carboxílicos se intercambian con facilidad, generando señales muy anchas e imprecisas, que se confunden, a menudo, con la línea base. La incorporación de cantidades crecientes de DMSO a la mezcla tiene la capacidad de minimizar los fenómenos de intercambio y, por consiguiente, la señal de los protones carboxílicos se define mejor y se vuelve más fácilmente identificable. Con este método, los autores consiguen correlacionar los resultados de RMN con los resultados de análisis clásico de grado de acidez.

Para comprobar el potencial del DMSO-d6, no sólo como alternativa en el análisis de grado de acidez, sino como disolvente capaz de alterar los valores de los desplazamientos químicos, llevamos a cabo el siguiente experimento. A partir de un mismo extracto lipídico se prepararon 4 muestras utilizando como disolvente mezclas $CDCl_3$/DMSO-d6 en diferentes proporciones. Los espectros de estas muestras se compararon frente al espectro de la muestra en $CDCl_3$ puro. En la Tabla 4.1 se recoge la composición de los 5 experimentos que fueron comparados. La proporción de DMSO en la mezcla oscila entre valores comprendidos entre un 8 y un 50 %.

Tabla 4.1: Composición de muestras con proporciones variables de mezcla de disolventes deuterados ($CDCl_3$:$(CD_3)_2SO$).

Muestra	Ext. Lip. (g)	$CDCl_3$ (µL)	DMSO-d6 (µL)	Ratio $CDCl_3$:$(CD_3)_2SO$
a)	0.13	600	0	-
b)	0.13	550	50	11:1
c)	0.13	500	100	5:1
d)	0.13	400	200	2:1
e)	0.13	300	300	1:1

De la comparación de los espectros (Figura 4.7) podemos extraer conclusiones interesantes. En primer lugar, tal y como Skiera propone, se puede apreciar cómo se hace más estrecha la señal de los protones carboxílicos conforme aumenta la proporción de DMSO. En segundo lugar, las señales de los 1,3-DAG se desplazan y desaparece el solapamiento. Tanto es así que a concentraciones altas de DMSO casi pueden aislarse no sólo una sino las dos señales de 1,3-DAG. Y, en tercer lugar, puede apreciarse el desdoblamiento de la señal **F**, de los metilenos en α de carbonilo, de manera que se distingue, independiente, la señal propia de los ácidos grasos libres.

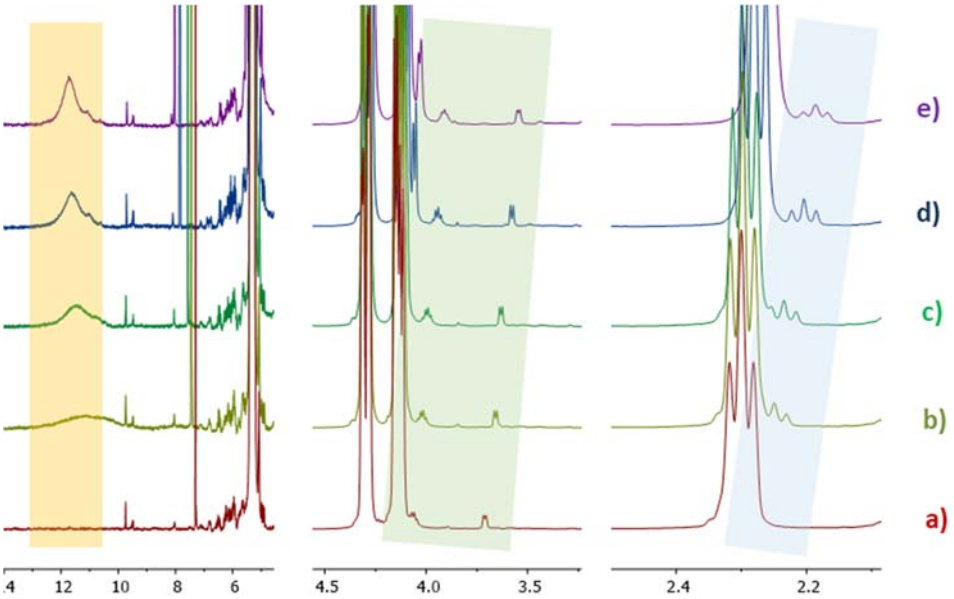


Figura 4.7: Comparación de espectros con proporciones variables de mezcla de disolventes deuterados ($CDCl_3$:$(CD_3)_2SO$). Efecto en la señal de los protones carboxílicos (amarillo), en el desplazamiento de las señales de DAG y MAG (verde) y en el desplazamiento de la señal de los protones en C1 de ácidos grasos libres (azul)

A la vista de los resultados queda claro que esta mezcla de disolventes tiene un potencial grandísimo, pues aporta varios beneficios y ninguna desventaja. Un único experimento de ^{1}H-RMN aporta toda la información composicional a la que ya teníamos acceso y además permite analizar 1,3-DAG sin necesidad de derivatización, a la par que también facilita la cuantificación de los ácidos grasos libres presentes.

Esta estrategia, sin embargo, presenta un cierto inconveniente de tipo práctico. En nuestra experiencia, la presencia de dos fuentes de deuterio dificulta el ajuste automático del *lock*, obligando a realizar ajustes manuales. Aunque no se trata de un inconveniente demasiado grande, sí que le resta potencial a la aplicación de la técnica en análisis rutinario de grasas y su automatización.

Animados por los buenos resultados de las mezclas con DMSO, quisimos probar otras mezclas de disolventes con sólo una fuente de deuterio. Un sustituto lógico

al cloroformo y que no aporte hidrógenos (ni deuterios) es el **tetracloruro de carbono** (CCl_4). No hay que olvidar que el tetracloruro de carbono fue extensamente usado como disolvente en los orígenes de la técnica, gracias a sus buenas propiedades como disolvente y gracias, precisamente, a que no introduce nuevos hidrógenos al análisis.

Los resultados obtenidos con mezclas de tetracloruro de carbono y dimetilsulfóxido hexadeuterado son muy buenos, incluso mejores que con cloroformo. La separación de las señales de 1,3-DAG y de ácidos grasos libres es todavía mayor. Se llevaron a cabo experimentos con diferentes proporciones $CCl_4/(CD_3)_2SO$, comprendiendo el intervalo de proporciones siguiente 11:1, 5:1, 3:1 y 2:1. La mayor diferencia se encontró en la señal de los protones carboxílicos, la cual se estrecha y define cada vez más a mayores concentraciones de DMSO. Respecto al resto de señales, el desplazamiento químico varía mínimamente en función de la concentración, pero la diferencia es prácticamente irrelevante. En definitiva, tras una optimización y ajuste, se optó por proporciones de 9 a 2 en la mezcla $CCl_4/(CD_3)_2SO$; pues permiten buenos resultados a nivel de automatización, solubilidad y de resolución de señales incluso a pesar de la poca cantidad del disolvente deuterado, del que tan sólo se necesitarían 100 µL por análisis. Cabe destacar también el ahorro en disolvente deuterado y, por tanto, en el coste total por análisis.

Lamentablemente, el CCl_4 es una de las sustancias reguladas por el Reglamento (CE) nº 2037/2000 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de junio de 2000, sobre las sustancias que agotan la capa de ozono. Su fabricación, venta o importación están prohibidas en Europa, sin siquiera excepciones para usos de investigación. Aunque este procedimiento de análisis sea sumamente ventajoso no puede ser propuesto como una solución a nuestro problema. Es, por tanto, necesario, continuar investigando disolventes (o mezclas) alternativos.

Siguiendo en la línea de disolventes apróticos, el siguiente candidato lógico es el **sulfuro de carbono**. El CS_2 y el DMSO no son solubles entre sí. Sin embargo, ciertas muestras grasas (grasas de alta lipólisis como las utilizadas hasta ahora como referencia, por ejemplo) puede actuar como codisolvente y permitir la mezcla de las tres sustancias. Esta eventualidad nos permitió ensayar el efecto de la mezcla

sobre los desplazamientos químicos y, de nuevo, los resultados son muy prometedores. La separación de los 1,3-DAG y los ácidos grasos libres es tanta como en el caso del tetracloruro de carbono. Podría decirse que el CS_2 es una alternativa apropiada para poder prescindir del prohibido CCl_4.

Sin embargo, aunque los resultados de las mezclas $CS_2/(CD_3)_2SO$ son muy prometedores, no podemos olvidar que presenta un punto débil: la solubilidad. Con grasas menos degradadas que la utilizada como referencia existen problemas de inmiscibilidad y se forman dos fases en el tubo de RMN. Para corregir este problema se optó por añadir una pequeña cantidad de $CHCl_3$ a la mezcla a modo de codisolvente. Al no ser deuterado se evita el problema de la doble fuente de deuterios, y la señal que origina es un singlete alejado de las señales de interés, por lo que no interfiere en absoluto con el resto del espectro. La mezcla ternaria $CS_2/(CD_3)_2SO/CHCl_3$ en proporciones 8:2:1 proporciona muy buenos resultados

En la Figura 4.8 puede apreciarse cómo se simplifican muchos de los problemas de solapamiento gracias al uso de las mezclas con DMSO-d6. Como principales ventajas, cabe destacar la capacidad de separación de las señales de los 1,3-DAG y de los ácidos grasos libres. Además, aunque menos relevante, se consigue una mejor separación de las señales **U** y **T** (olefínicos y *sn*-2 de TAG). También, los multipletes de las señales *sn*-1 y *sn*-3 de los 1-MAG son más estrechos, lo que facilita su discriminación y evita el solapamiento con la señal $-C\underline{H}_2OH$ de los 1,2-DAG.

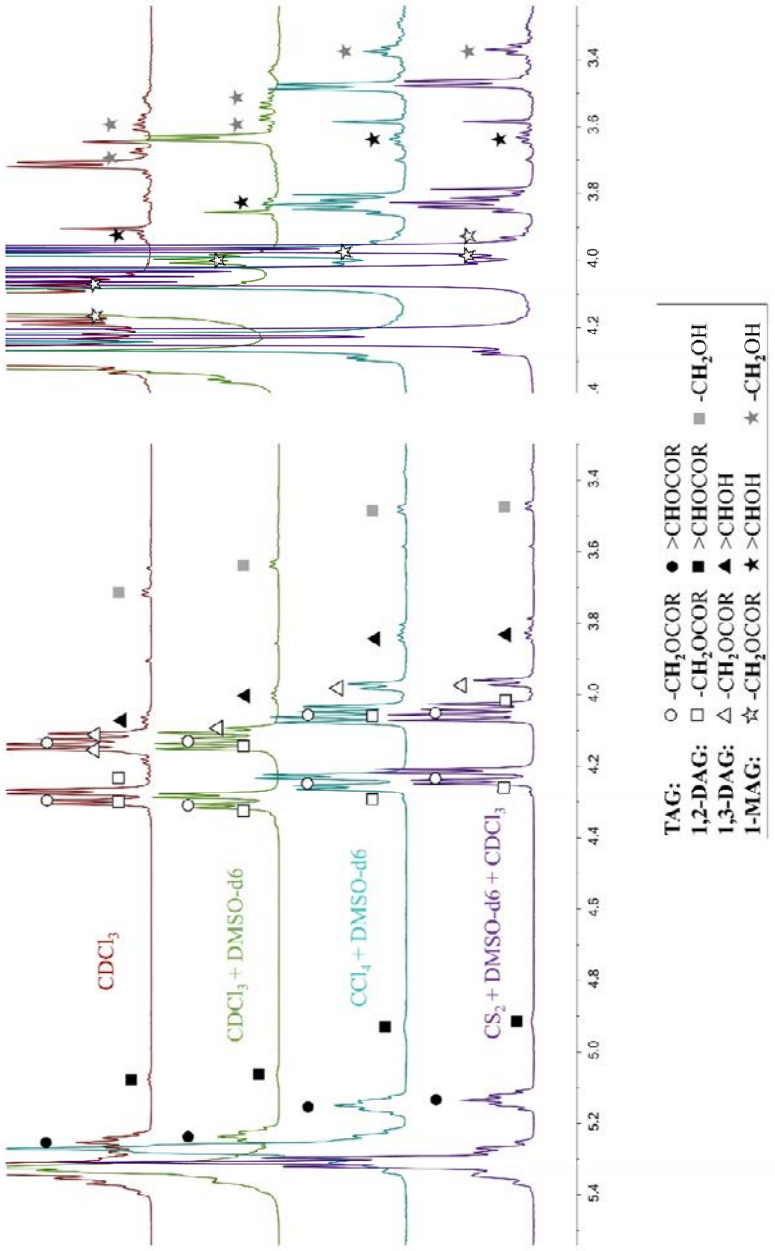


Figura 4.8: Efecto de las mezclas de DMSO-d6 en los δ de las señales de los restos glicerilo.

En definitiva, a la hora de cuantificar los productos de lipólisis, contamos con, al menos, una señal aislada e integrable para cada tipo. Con la mezcla de disolventes $CS_2/(CD_3)_2SO/CHCl_3$ en proporciones 8:2:1, los 1,2-DAG pueden ser cuantificados a partir de la señal **S** a 4.86, aunque en ausencia de 2-MAG (lo cual es habitual en embutido) también puede usarse la señal **K** a 3.41. Para los 1,3-DAG se puede utilizar la señal **M** a 3.77, y para los 1-MAG y 2-MAG las señales **L** a 3.56 y **R** a 4.63 respectivamente.(Figura 4.9)

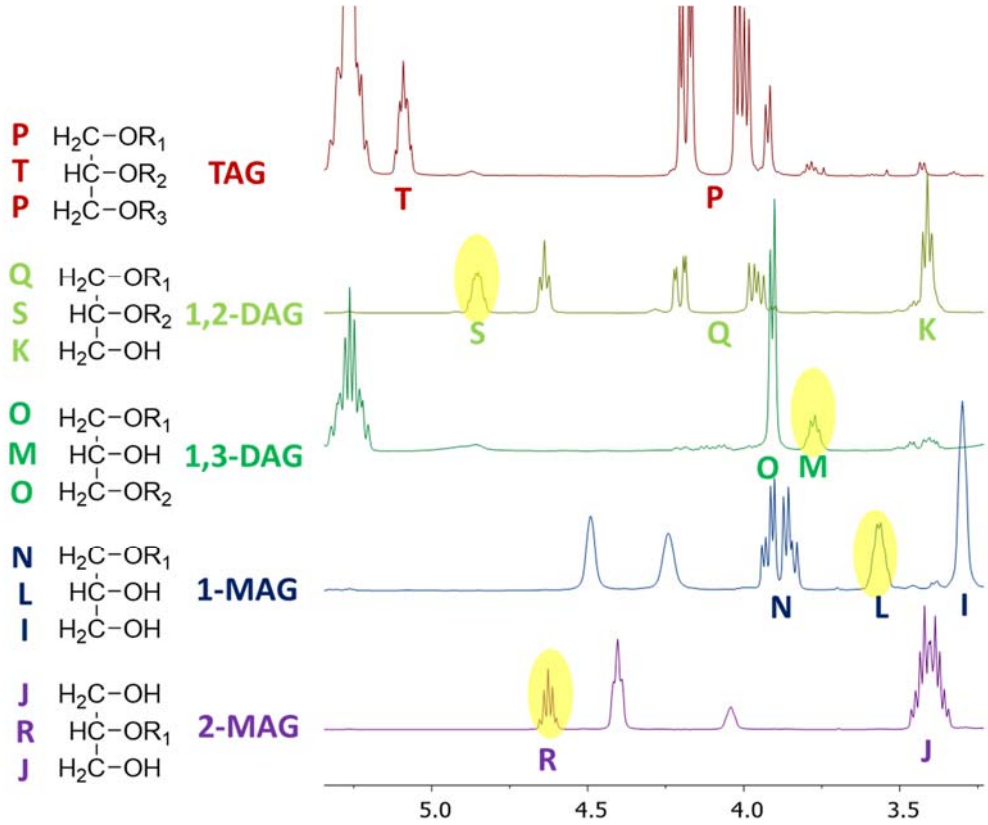


Figura 4.9: Señales características de los patrones de di-y monoacilgliceroles en CS_2:$(CD_3)_2SO$:$CHCl_3$

4.3.4. Otras mezclas

Las mezclas de DMSO son una solución muy apropiada para el estudio de grasas en RMN. Además, desde el punto de vista económico supone una estrategia muy asequible, pues la cantidad de disolvente deuterado utilizado en cada análisis es

relativamente pequeña (100 μL). Puesto que la estrategia de mezclas ha generado tan buenos resultados, se decidió probar también las mezclas de CCl_4 y CS_2 con otros disolventes deuterados, como benceno-d6, acetona-d6 y también con acetonitrilo-d3.

Para el benceno-d6, las mezclas con CCl_4 tanto como con CS_2 son interesantes. Las señales de los 1,3-DAG pueden integrarse, y las señales **E** y **F** están ahora separadas, al contrario de lo que sucedía con el benceno-d6 sin mezclar. En general se obtienen los mismos beneficios que con las mezclas de DMSO-d6, a excepción de que no se separa la señal **F** de los ácidos grasos libres.

Para la acetona-d6, nos encontramos con resultados similares. Podemos integrar los 1,3-DAG, pero la señal **F** de los ácidos grasos libres no se separa. Además, persiste el inconveniente de que la señal residual del disolvente se solapa con la señal **E**.

Con el acetonitrilo-d3, sólo es posible la mezcla con CCl_4; la inmiscibilidad con el CS_2 es insalvable. La mezcla resulta útil, pues se logra discriminar una de las señales de los 1,3-DAG, pero de nuevo falla en la separación de la señal **F** de los ácidos grasos libres.

En la aparecen resumidos los desplazamientos químicos de las diferentes señales del resto glicerol para cada una de las 11 opciones de disolventes o mezclas de disolventes probadas.

A modo de conclusión, aunque cualquiera de las mezclas ensayadas aporta ventajas frente el análisis clásico en $CDCl_3$, es la mezcla de DMSO-d6 la que, en términos globales, aporta más beneficios, pues no sólo elimina solapamientos en la zona de los protones de glicerol, sino que también permite el análisis de los ácidos grasos libres.

		$CDCl_3$	$CDCl_3$ + $(CD_3)_2SO$	CCl_4 + $(CD_3)_2SO$	CS_2 + $(CD_3)_2SO$ + $CHCl_3$	C_6D_6	CCl_4 + C_6D_6	CS_2 + C_6D_6	$(CD_3)_2CO$	CCl_4 + $(CD_3)_2CO$	CS_2 + $(CD_3)_2CO$	CCl_4 + CD_3CN
TAG	$-CH_2OCOR$	4.10-4.32	4.10-4.33	3.96-4.23	3.97-4.23	4.01-4.31	3.97-4.27	3.91-4.19	4.12-4.36	4.01-4.27	3.94-4.20	4.00-4.28
	>CHOCOR	5.22-5.28	5.20-5.28	5.05-5.14	5.06-5.14	5.30-5.38	5.12-5.21	5.04-5.13	5.22-5.29	5.10-5.18	5.01-5.11	5.11-5.20
1,2-DAG	$-CH_2OH$	3.68-3.77	3.60-3.67	3.39-3.45	3.38-3.44	3.48-3.56	3.54-3.58	3.47-3.52	3.64-3.69	3.56-3.62	3.47-3.54	3.49-3.62
	$-CH_2OCOR$	4.19-4.36	4.11-4.38	3.94-4.26	3.93-4.23	4.17-4.42	4.11-4.31	4.04-4.24	4.12-4.39	4.03-4.31	3.94-4.22	4.03-4.28
	>CHOCOR	5.05-5.12	5.03-5.11	4.83-4.92	4.81-4.89	5.11-5.19	4.93-5.02	4.85-4.93	5.02-5.11	4.91-4.98	4.81-4.90	4.85-4.92
1,3-DAG	>CHOH	4.03-4.11	3.94-4.03	3.74-3.82	3.73-3.81	3.82-3.92	3.87-3.94	3.79-3.88	3.98-4.06	3.89-3.96	3.80-3.88	3.85-3.94
	$-CH_2OCOR$	4.12-4.20	4.05-4.11	3.88-3.95	3.88-3.93	4.07-4.13	4.01-4.09	3.94-4.01	4.06-4.14	3.98-4.08	3.89-4.00	3.96-4.05
1-MAG	$-CH_2OH$	3.55-3.76	3.48-3.63	3.27-3.36	3.27-3.34	3.36-3.53	3.35-3.62	3.32-3.51	3.48-3.59	3.41-3.56	3.40-3.55	3.37-3.55
	>CHOH	3.89-3.95	3.78-3.87	3.53-3.6	3.52-3.61	3.68-3.78	3.69-3.80	3.64-3.72	3.78-3.85	3.71-3.79	3.60-3.69	3.68-3.78
	$-CH_2OCOR$	4.13-4.22	4.05-4.14	3.85-3.95	3.82-3.95	4.07-4.20	4.01-4.09	3.90-4.01	4.02-4.16	3.98-4.05	3.88-3.95	3.96-4.05
2-MAG	$-CH_2OH$	3.77-3.88	3.62-3.72	3.41-3.56	3.33-3.48	3.51-3.61	3.57-3.68	3.50-3.61	3.61-3.75	3.58-3.69	3.48-3.59	3.53-3.65
	>CHOCOR	4.88-4.96	4.81-4.90	4.65-4.73	4.58-4.67	4.83-4.92	4.71-4.79	4.67-4.74	4.83-4.91	4.70-4.78	4.59-4.67	4.68-4.77

4.4 APLICACIÓN AL ANÁLISIS

Puesto que la mezcla basada en DMSO-d6 aporta bastantes ventajas, decidimos aplicarla al análisis de grasa de embutido.

Basándonos en la experiencia previa, optamos por utilizar las mismas condiciones experimentales usadas anteriormente con $CDCl_3$, a excepción del disolvente, que pasa a ser $CS_2/(CD_3)_2SO/CHCl_3$ en proporciones 8:2:1. En resumen, se utiliza una proporción de disolvente a muestra de 4.5:1; programa de pulsos con desacoplamiento de ^{13}C tipo waltz16, número de barridos ns = 64 y demora de relajación d1 = 10 s.

Para mejorar la repetibilidad, se descartan las micropipetas automáticas en favor de pipetas de vidrio clásicas. Las micropipetas automáticas son muy precisas cuando se trata de agua, pero con otros disolventes de diferente viscosidad y diferente volatilidad el error de pipeteo puede ser hasta a 5 veces mayor que con pipetas de vidro. El error de pipeteo con las pipetas clásicas es de 0.53% para volúmenes en torno a 1 mL y de 1.08% para volúmenes en torno a 0.1 mL.

En una muestra típica de extracto lipídico de embutido encontraremos las señales mayoritarias representadas en la Figura 4.10. En principio se trata de las mismas señales anteriormente identificadas con $CDCl_3$, aunque los desplazamientos químicos son ligeramente diferentes; por ejemplo, las señales **T** y **U** se resuelven mejor. Y como principal particularidad, ahora hay dos tipos de señales **F** diferentes, las correspondientes a ácidos grasos libres (**F_a**) y las de los ácidos grasos unidos a glicerilo (**F_b**).

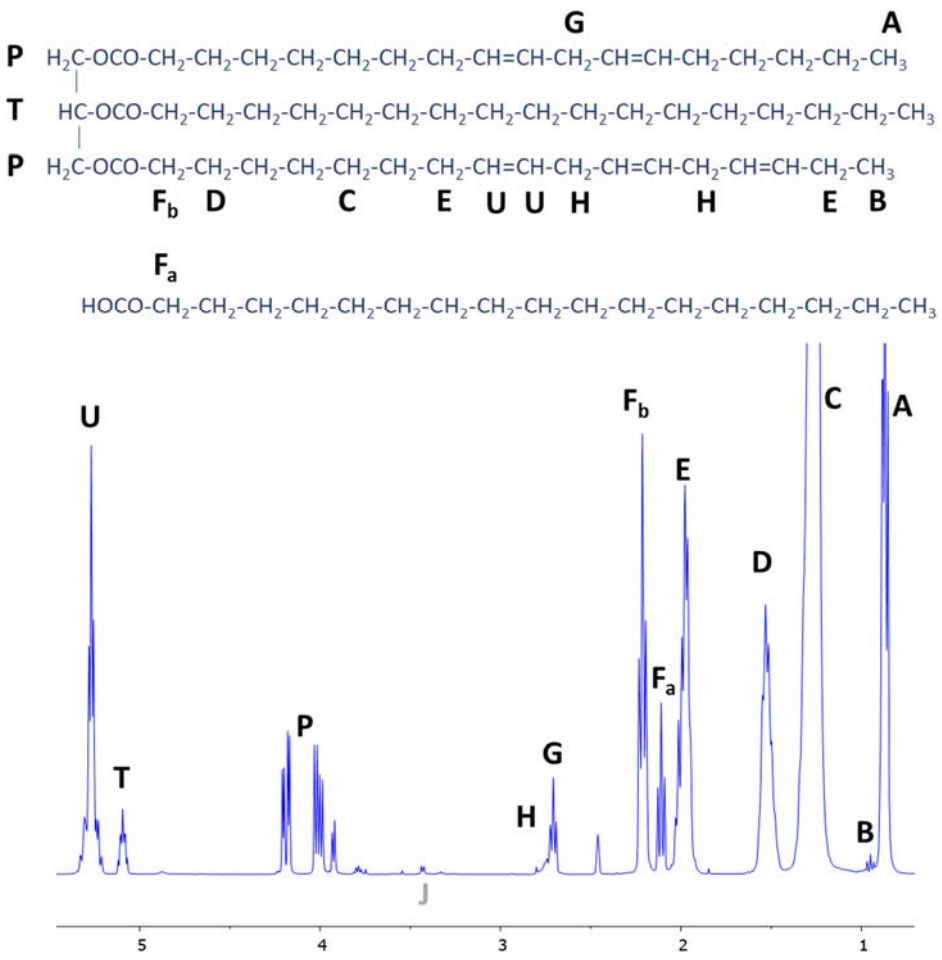


Figura 4.10: Principales señales en una muestra de extracto lipídico de embutido, utilizando la mezcla de disolventes $CS_2/(CD_3)_2SO/CHCl_3$.

En la Figura 4.11 aparecen identificadas las señales minoritarias de diglicéridos y monoglicéridos. Las señales propias de 1,3-DAG son **M** y **O**. En el caso de los 1,2-DAG, las señales son **K, Q** y **S**. La señal **Q** se solapa con la señal mayoritaria **P** de triglicéridos. Para los 1-MAG las señales son **N**, **L** e **I**. La señal **N** se solapa con la señal **O** de 1,3-DAG. Por último, las señales de los 2-MAG son **J** y **R**. En nuestra experiencia, en ninguna muestra de extracto lipídico hemos detectado señales de 2-MAG nunca. En el caso de que estuviesen presentes, la señal **J** solaparía junto a la señal **K** de 1,2-DAG.

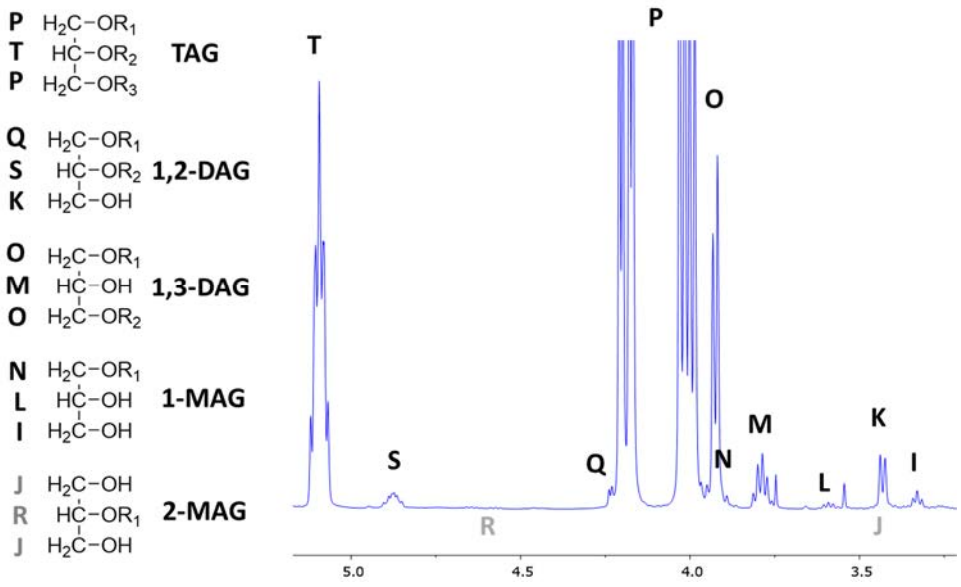


Figura 4.11: Señales de protones de glicerilo en una muestra de extracto lipídico de embutido utilizando la mezcla de disolventes $CS_2/(CD_3)_2SO/CHCl_3$.

A la hora de cuantificar, las señales correspondientes al protón en posición *sn*-2 de cada tipo de glicerilo (**L**, **M**, **R**, **S**, y **T**) están libres de solapamientos, por lo que pueden ser utilizadas con fines analíticos. No obstante, estas señales se corresponden con un solo protón (>C<u>H</u>O-) y su intensidad es más pequeña que las otras señales glicerílicas, que se corresponden a dos protones (-C<u>H</u>$_2$O-). En ocasiones, cuando la intensidad de las señales *sn*-2 es muy pequeña, conviene utilizar las señales más intensas posibles para tratar de minimizar el error. Así, por ejemplo, puede utilizarse la señal **O** (4 veces mayor) en vez de la **M** para cuantificar los 1,3-DAG, siempre y cuando la presencia de 1-MAG sea despreciable, o incluso puede optarse por restar la contribución de 1-MAG a la señal **O**. De manera similar, para los 1,2-DAG la señal **K** es el doble de grande que la **S**, y puede utilizarse siempre que no haya 2-MAG interfiriendo. Por último, los 1-MAG pueden estimarse también a partir de la señal **I**, que es el doble de grande que la **L**.

Para calcular los porcentajes de mono- y diglicéridos se pueden aplicar las siguientes fórmulas:

$$\% \text{ 1,3-DAG} = \mathbf{M} / \mathbf{T} = (\mathbf{O} - \mathbf{I}) / 4\,\mathbf{T}$$

$$\% \text{ 1,2-DAG} = \mathbf{S} / \mathbf{T} = \mathbf{K} / 2\,\mathbf{T}$$

$$\% \text{ 1-MAG} = \mathbf{L} / \mathbf{T} = \mathbf{I} / 2\,\mathbf{T}$$

En la Tabla 4.2 aparecen agrupadas todas las señales de interés para extracto lipídico de embutido. De manera similar a lo anteriormente propuesto, podemos utilizar los valores de integral de las respectivas señales para cuantificar. La proporción de grasa saturada (%s) e insaturada (%u) puede calcularse de la siguiente manera:

$$\%u = 100 \times (\mathbf{E} / 2(\mathbf{F_a} + \mathbf{F_b}))$$

$$\%s = 100 \times (1 - (\%u))$$

Para grasas de origen vegetal, o grasas animales de monogástricos (embutido de cerdo, por ejemplo) las cadenas acílicas poliinsaturadas están formadas en un 95% por sólo dos tipos de ácidos grasos: linoleico (omega-6) y linolénico (omega-3). El cálculo de los porcentajes de linoleico (%l), linolénico (%ln) y monoinsaturados (%m) sería el siguiente:

$$\%ln = 100 \times (\mathbf{B} / (\mathbf{A} + \mathbf{B}))$$

$$\%l = 100 \times (\mathbf{G} / (\mathbf{F_a} + \mathbf{F_b})) \qquad \text{(si la señal } \mathbf{G} \text{ puede integrarse por separado)}$$

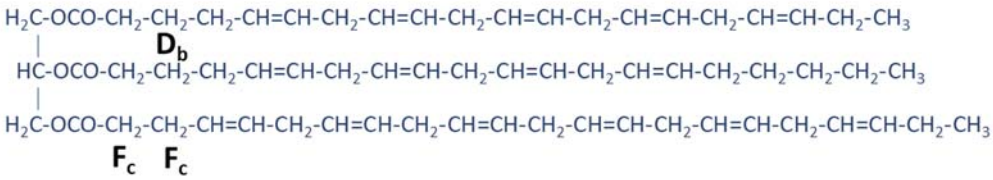
$$\%l = 100 \times (((\mathbf{G} + \mathbf{H}) / (\mathbf{F_a} + \mathbf{F_b}))) - 2 \times (\%ln) \qquad \text{(cuando } \mathbf{G} \text{ y } \mathbf{H} \text{ se solapan)}$$

$$\%m = (\%u) - (\%l) - (\%ln)$$

Tabla 4.2:Señales de RMN de extracto lipídico de embutido; desplazamiento químico y descripción.

Señal	δ (ppm)		Descripción
A	0.82-0.92	$-C\underline{H}_3$	metilo (excepto n-3)
B	0.92-0.98	$-C\underline{H}_3$	metilo (n-3)
C	1.17-1.38	$-(C\underline{H}_2)_n-$	otros metilenos en cadenas alquílicas.
D	1.47-1.59	$-OCO-CH_2-C\underline{H}_2-$	metileno C3 (excepto EPA, ARA y DHA)
E	1.92-2.07	$-C\underline{H}_2-CH=CH-$	alílicos. (excepto C3 de DHA)
F_a	2.08-2.15	$HOCO-C\underline{H}_2-$	metileno C2 en ácidos grasos libres
F_b	2.17-2.26	$-OCO-C\underline{H}_2-$	metileno C2 (excepto ácidos grasos libres)
G	2.68-2.74	$=HC-C\underline{H}_2-CH=$	bis-alílicos (di-insaturados)
H	2.73-2.84	$=HC-C\underline{H}_2-CH=$	bis-alílicos (poli-insaturados)
I	3.27-3.34	$-C\underline{H}_2OH$	*sn*-3 de glicerilo en 1-MAG
J	3.33-3.48	$-C\underline{H}_2OH$	*sn*-1 y 3 de glicerilo en 2-MAG
K	3.39-3.47	$-C\underline{H}_2OH$	*sn*-3 de glicerilo en 1,2-DAG
L	3.55-3.63	$>C\underline{H}OH$	*sn*-2 de glicerilo en 1-MAG
M	3.75-3.83	$>C\underline{H}OH$	*sn*-2 de glicerilo en 1,3-DAG
N	3.82-3.95	$-C\underline{H}_2OCOR$	*sn*-1 de glicerilo en 1-MAG
O	3.88-3.95	$-C\underline{H}_2OCOR$	*sn*-1 y 3 de glicerilo en 1,3-DAG
P	3.97-4.23	$-C\underline{H}_2OCOR$	*sn*-1 y 3 de glicerilo en TAG
Q	3.93-4.23	$-C\underline{H}_2OCOR$	*sn*-1 de glicerilo en 1,2-DAG
R	4.58-4.67	$>C\underline{H}OCOR$	*sn*-2 de glicerilo en 2-MAG
S	4.81-4.89	$>C\underline{H}OCOR$	*sn*-2 de glicerilo en 1,2-DAG
T	5.06-5.14	$>C\underline{H}OCOR$	*sn*-2 de glicerilo en TAG
U	5.18-5.38	$-\underline{H}C=C\underline{H}-$	olefínicos

Para otro tipo de alimentos que contienen cantidades significativas de DHA o EPA hay que recurrir a otros cálculos. Las grasas como el DHA o EPA generan señales independientes que facilitan su análisis. En nuestro caso, distinguiríamos 3 tipos de señales diferentes para los protones unidos al carbono C2, esto es, **F_a** (ácidos grasos libres), **F_b** (ácidos grasos esterificados) y **F_c** (exclusivamente C2 y C3 del DHA). Asimismo, la señal **D** ahora se discrimina en **D_a** y **D_b**,. Ésta última se corresponde con los protones en C3 de ARA y EPA. (Figura 4.12)



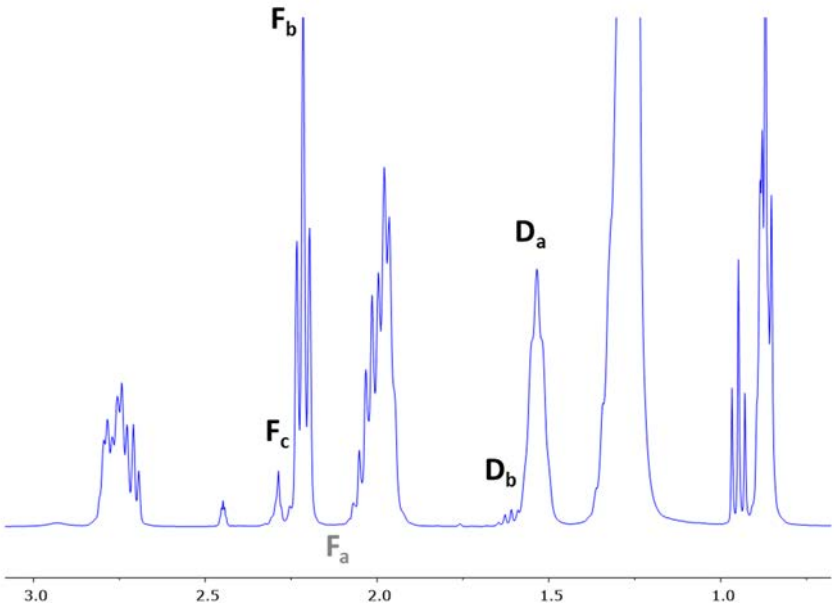


Figura 4.12: Señales propias de DHA, EPA y ARA utilizando la mezcla de disolventes $CS_2/(CD_3)_2SO/CHCl_3$

Los cálculos a utilizar en este tipo de alimentos son los siguientes:

$$\%(EPA + ARA) = 100 \times (\mathbf{D_b} / (\mathbf{D_a} + \mathbf{D_b}))$$

$$\%DHA = 100 \times (\mathbf{F_c} / (2\ \mathbf{F_a} + 2\ \mathbf{F_b} + \mathbf{F_c}))$$

$$\%u = 100 \times (2\ \mathbf{E} / (4\ \mathbf{F_a} + 4\ \mathbf{F_b} + \mathbf{F_c}))$$

$$\%n\text{-}3 = 100 \times (\mathbf{B} / (\mathbf{A} + \mathbf{B}))$$

La señal de los protones olefínicos de las grasas trans, $\mathbf{U_b}$ (δ = 5.24 - 5.37), presenta un desplazamiento químico algo diferente al de las grasas cis, $\mathbf{U_a}$ (δ = 5.18 – 5.38), aunque se solapan (Figura 4.13). A pesar del solapamiento existe una forma de poder estimar la proporción de grasas trans valiéndonos de la simetría de la señal $\mathbf{U_a}$: la diferencia entre la integral de la primera y segunda mitad de la señal se corresponde aproximadamente con el valor de $\mathbf{U_b}$; esto es: Int ($\mathbf{U_b}$) = Int (5.27 – 5-36) – Int (5.18 – 5.27). Esta estimación debe ser usada con precaución, pues si el contenido en grasas trans es muy pequeño corremos el riesgo de que el error de la estimación sea mayor incluso que el valor resultante.

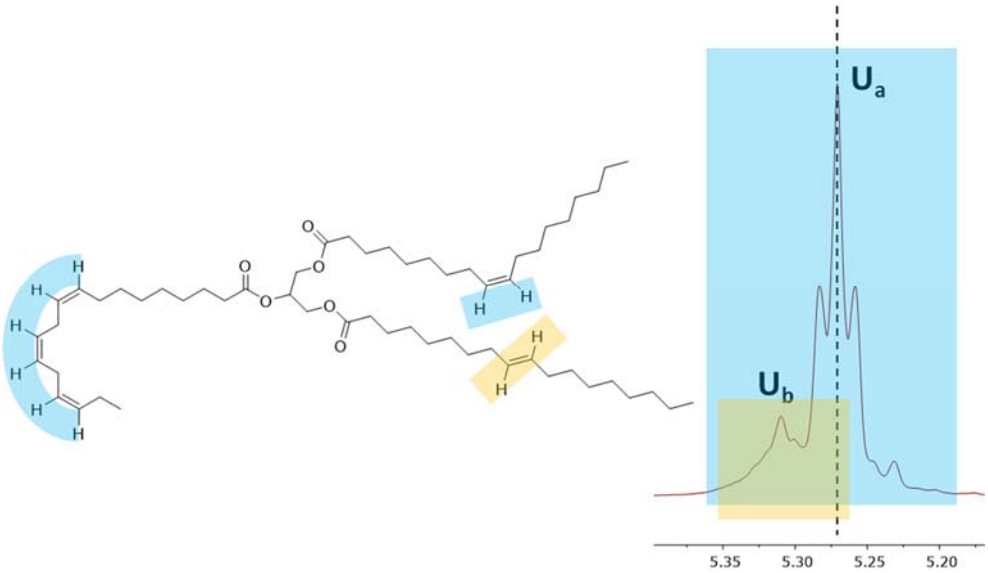


Figura 4.13: Señales de protones olefínicos cis y trans, utilizando la mezcla de disolventes $CS_2/(CD_3)_2SO/CHCl_3$.

A continuación se adjunta la Tabla 4.3 , que complementa a la tabla anterior incluyendo las señales propias de otras grasas animales como las debidas al DHA o EPA o a las grasas trans.

Tabla 4.3: Señales RMN en otras grasas animales. Desplazamiento químico y descripción.

Señal	δ (ppm)		Descripción
D_a	1.47-1.59	-OCO-CH_2-$C\underline{H}_2$-	metileno C3 (exc. EPA, ARA y DHA)
D_b	1.58-1.65	-OCO-CH_2-$C\underline{H}_2$-	metileno C3 en EPA y ARA
F_a	2.08-2.15	HOCO-$C\underline{H}_2$-	metileno C2. Ácidos grasos libres
F_b	2.17-2.26	-OCO-$C\underline{H}_2$-	metileno C2 (exc. DHA)
F_c	2.27-2.31	-OCO-$C\underline{H}_2$-$C\underline{H}_2$-	metileno C2 y C3 de DHA
U_a	5.18-5.38	-$\underline{H}$C=C$\underline{H}$-	olefínicos
U_b	5.24-5.37	-$\underline{H}$C=C$\underline{H}$-	olefínicos (*trans*)

Cuantificación absoluta y referencia interna

Las fórmulas presentadas hasta el momento permiten la determinación de la concentración relativa y se basa en la comparación entre sí de señales contenidas en la muestra. También es posible la **determinación absoluta** de la concentración de las diferentes especies y, para ello es necesario incorporar una sustancia de referencia con concentración conocida. La cantidad de una sustancia *x* en la muestra puede calcularse a partir de la siguiente fórmula

$$m_{(x)} = P_{(std)} \cdot m_{(std)} \cdot \frac{MW_{(x)}}{MW_{(std)}} \cdot \frac{nH_{(std)}}{nH_{(x)}} \cdot \frac{A_{(x)}}{A_{(std)}}$$

Donde $m_{(x)}$ y $m_{(std)}$ son las masas de la incógnita y de la referencia, $P_{(std)}$ es el porcentaje de pureza de la referencia, $MW_{(x)}$ y $MW_{(std)}$ son los pesos moleculares, $nH_{(x)}$ y $nH_{(std)}$ son el número de protones que contribuye a cada señal y $A_{(x)}$ y $A_{(std)}$ son las áreas de las señales.

La elección de una referencia interna en RMN cuantitativa es de crucial importancia. Debe cumplir una serie de requisitos como, por ejemplo, pureza, solubilidad, facilidad de manejo, no reaccionar con la muestra y, sobre todo, debe generar señales únicas que no solapen con las señales de la muestra y a ser posible a desplazamiento químicos no muy diferentes de los de las señales de la muestra.[7]

Para las muestras de grasa, el BTMSB (1,4-bis(trimetilsilil)benceno) es un candidato ideal. Genera dos señales singlete a 0.22 y 7.48 ppm en $CDCl_3$. Los desplazamientos en la mezcla de disolventes $CS_2/(CD_3)_2SO/CHCl_3$ difieren ligeramente y son 0.23 y 7.39. Los tiempos de relajación longitudinal (T1) son 2.4 y 2.2 s respectivamente.[8]

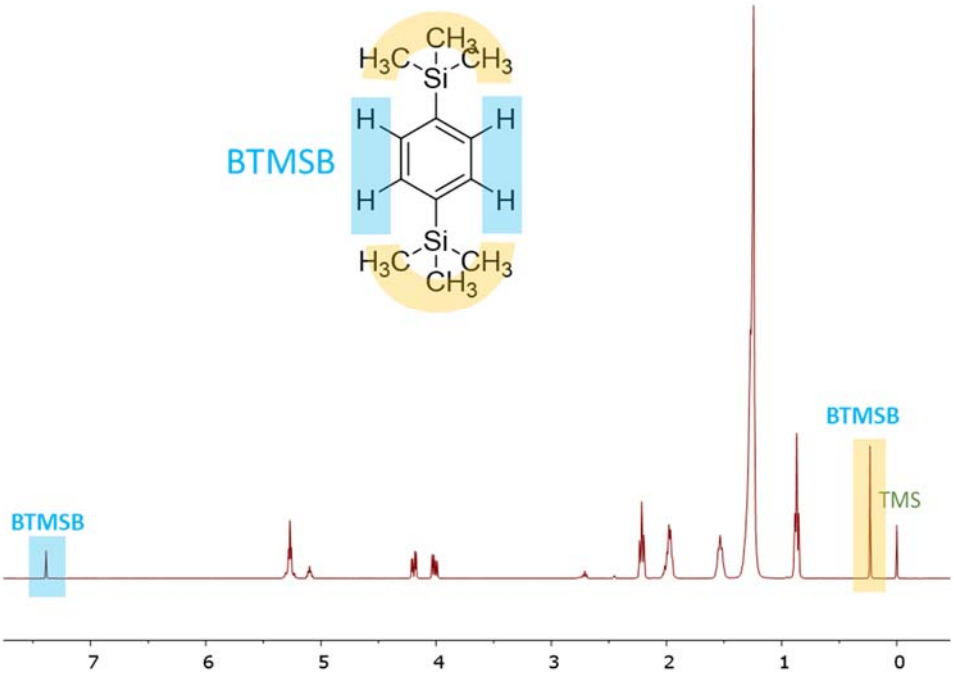


Figura 4.14: Espectro de RMN de una muestra de grasa con BTMSB como referencia interna en la mezcla de disolventes CS_2:$(CD_3)_2SO$:$CHCl_3$

4.5 CONCLUSIONES

La utilización de diferentes disolventes deuterados o mezclas puede resolver muchos de los problemas de solapamientos más habituales. En particular, la mezcla CS_2:$(CD_3)_2SO$:$CHCl_3$ facilita enormemente el análisis de DAG y MAG (sin necesidad de derivatizaciones ni equipos de campo alto) y permite analizar los ácidos grasos libres presentes en la muestra. Asimismo es posible analizar DHA, EPA y ARA e incluso grasas *trans*, siempre que su presencia sea relativamente abundante. En definitiva, se trata de una alternativa rápida, sencilla y eficiente para el análisis de grasas con equipos de RMN de campo medio.

4.6 BIBLIOGRAFÍA

(1) Cross, B. P.; Schleich, T. Temperature Dependence of the Chemical Shifts of Commonly Employed Proton N.M.R. Reference Compounds. *Org. Magn. Reson.* **1977**, *10* (1), 82–85.

(2) Muller, N.; Reiter, R. C. Temperature Dependence of Chemical Shifts of Protons in Hydrogen Bonds. *J. Chem. Phys.* **1965**, *42* (9), 3265–3269.

(3) Abraham, R. J.; Byrne, J. J.; Griffiths, L.; Perez, M. ^{1}H Chemical Shifts in NMR: Part 23, the Effect of Dimethyl Sulphoxide versus Chloroform Solvent on ^{1}H Chemical Shifts. *Magn. Reson. Chem.* **2006**, *44* (5), 491–509.

(4) Satyarthi, J. K.; Srinivas, D.; Ratnasamy, P. Estimation of Free Fatty Acid Content in Oils, Fats, and Biodiesel by ^{1}H NMR Spectroscopy. *Energy and Fuels* **2009**, *23* (4), 2273–2277.

(5) Sacchi, R.; Addeo, F.; Paolillo, L. ^{1}H and ^{13}C NMR of Virgin Olive Oil. An Overview. *Magn. Reson. Chem.* **1997**, *35* (13), S133–S145.

(6) Skiera, C.; Steliopoulos, P.; Kuballa, T.; Holzgrabe, U.; Diehl, B. Determination of Free Fatty Acids in Edible Oils by ^{1}H NMR Spectroscopy. *Lipid Technol.* **2012**, *24* (12), 279–281.

(7) Rundlöf, T.; Mathiasson, M.; Bekiroglu, S.; Hakkarainen, B.; Bowden, T.; Arvidsson, T. Survey and Qualification of Internal Standards for Quantification by ^{1}H NMR Spectroscopy. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2010**, *52* (5), 645–651.

(8) Pinciroli, V.; Biancardi, R.; Colombo, N.; Colombo, M.; Rizzo, V. Characterization of Small Combinatorial Chemistry Libraries by ^{1}H NMR. Quantitation with a Convenient and Novel Internal Standard. *J. Comb. Chem.* **2001**, *3* (5), 434–440.

CAPÍTULO 5
VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA

Contenido

5.1 ANÁLISIS CUANTITATIVO 141
5.2 COMPARACIÓN FRENTE A MÉTODOS CLÁSICOS 142
5.3 EJEMPLO DE APLICACIÓN. MONITORIZACIÓN DE LA DEGRADACIÓN TÉRMICA DE ACEITES 147
5.4 BIBLIOGRAFÍA 153

"Somos lo que hacemos repetidamente. La excelencia, entonces, no es un acto, es un hábito"

Aristóteles

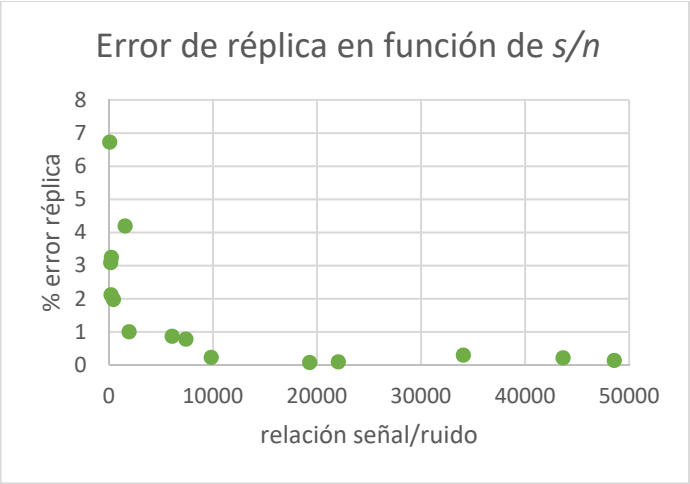
5.1 ANÁLISIS CUANTITATIVO

La RMN ha sido validada en términos generales para el análisis cuantitativo y se acepta que la exactitud de la RMN en estudios de mezclas modelo es superior al 98.5%, e incluso puede mejorarse (>99%), cuando las condiciones experimentales permanecen lo más constantes posible (pH, temperatura, fuerza iónica, interacciones químicas…).[1,2] Las limitaciones referentes a especificidad y selectividad dependen, principalmente, de que las sustancias a analizar dispongan de, al menos, una señal distinguible y no solapada. También, es necesario que la intensidad de las señales sea suficiente, pues existe una relación entre la relación señal-ruido y la incertidumbre del resultado. En estudios de otros autores,[2] se propone que una relación señal-ruido de al menos 150 es necesaria para garantizar una incertidumbre del 1% o menor. Es por ello que, frecuentemente, se recomiendan relaciones señal-ruido de 250 para análisis cuantitativo. En el caso de nuestras muestras de extracto lipídico puede ocurrir que las señales minoritarias como, por ejemplo, los mono-y diglicéridos no alcancen ese límite, sobre todo en muestras con baja lipólisis. Esta eventualidad nos obliga a ser prudentes a la hora de interpretar los resultados.

Siendo como es la RMN una técnica intrínsecamente robusta, la principal fuente de error en RMN puede venir de la preparación de la muestra y de las condiciones experimentales de análisis, tanto al adquirir el espectro como al procesarlo posteriormente. Se trata de errores introducidos por el operario o analista.

Para estudiar la robustez de nuestro método y de nuestra operativa, se prepararon 9 tubos de muestra a partir de un mismo extracto lipídico de embutido. Se analizaron con RMN con el procedimiento habitual, se procesaron con MestreNova y los espectros fueron comparados entre sí. Para cada señal, los valores de la integral se promediaron y se calculó la desviación estándar. Se definió como error de repetibilidad, el valor resultante de dividir la desviación estándar entre el valor medio (en tanto por ciento).

La repetibilidad es muy alta para las señales mayoritarias, pero no es así con las señales minoritarias. En la siguiente gráfica (Gráfica 5.1**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) se compara el porcentaje de error en las réplicas en función de la relación señal/ruido (*s/n*) de cada señal. Puede observarse claramente cómo disminuye la repetibilidad cuando *s/n* es bajo (para facilitar la visualización se han omitido los valores correspondientes a *s/n* muy altos)



Gráfica 5.1: Representación gráfica del porcentaje de error de réplica en función de la relación señal/ruido

Se constata, por tanto, que la incertidumbre para las señales por encima del umbral de señal/ruido es muy baja, inferior al 1%, pero debemos ser cautos con las señales pequeñas, pues no podemos garantizar tal incertidumbre. En el caso de las señales más pequeñas, nuestra incertidumbre no es inferior al 1% sino que estaría por debajo del 7%. Las señales que más habitualmente se verán afectadas por esta limitación serán las correspondientes a 1-MAG; y en grasas con muy poca lipólisis, también las de 1,2-DAG y 1,3-DAG.

5.2 COMPARACIÓN FRENTE A MÉTODOS CLÁSICOS

También fue comparada la capacidad de la técnica de RMN como alternativa a otros métodos de análisis clásicos como el índice de yodo y la acidez libre.

El análisis de acidez libre es una técnica clásica de análisis que permite estimar la cantidad de ácidos grasos libres presentes en la muestra. Es, por tanto, un indicador del grado de lipólisis. El análisis consiste en una volumetría donde se añade una disolución valorada de hidróxido potásico (KOH) en etanol sobre la grasa disuelta en etanol/éter dietílico hasta neutralización y viraje de indicador (fenolftaleína). El resultado se expresa como mg de KOH por g de grasa o como porcentaje de ácido oleico libre.

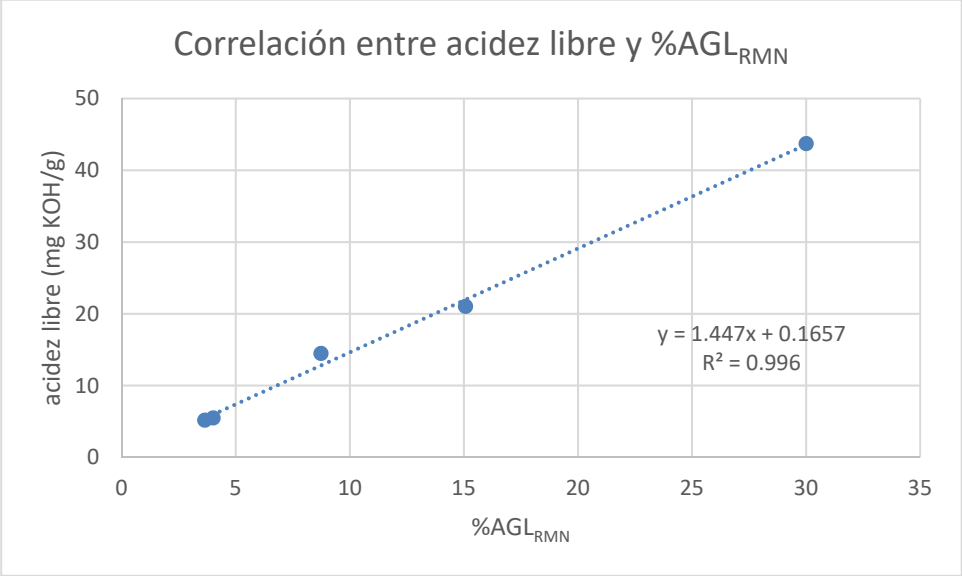
Algunos autores han propuesto, anteriormente, estrategias de análisis de RMN para calcular la acidez libre. En ambos casos, la correlación de resultados frente a la técnica clásica fue muy satisfactorio. Una de las dos estrategias se fundamenta en la pequeña diferencia de δ entre los carbonos C2 en función de si el ácido graso está libre o esterificado. Con $CDCl_3$ como disolvente ambas señales están prácticamente solapadas, aunque uno de los tres picos del pseudo-triplete puede diferenciarse sin solapar. Los autores proponen usar este pico para el cálculo de la proporción entre ácidos grasos libres y esterificados.[3] Otra de las estrategias propone una aproximación completamente diferente. En este caso, se utiliza como disolvente una mezcla de DMSO-d6 y $CDCl_3$. El efecto del disolvente consigue que la señal de los protones carboxílicos de los ácidos grasos libres se vuelva más estrecha y más precisa de integrar, lo que permite su cuantificación.[4,5]

Con nuestro procedimiento de RMN, gracias a la mezcla de disolventes, la señal que originan los carbonos C2 de los ácidos grasos libres (**F_a**) no se solapa con la señal de los carbonos C2 de los ácidos grasos esterificados (**F_b**), facilitando sensiblemente el cálculo. La proporción de ácidos grasos libres frente a ácidos grasos esterificados ($\%AGL_{RMN}$) puede calcularse a partir de la relación entre las integrales de ambas señales de la siguiente forma:

$$\%AGL_{RMN} = 100 \times (I_{Fa} / I_{Fb})$$

Para corroborar la validez de esta estimación llevamos a cabo un estudio de correlación. Para ello, 5 muestras de extractos lipídicos con grados de lipólisis variados fueron analizadas a la vez por el método clásico de análisis de acidez libre y por el método de RMN. Las cinco muestras incluían muestras con bajo índice de acidez libre como extracto lipídico de nuez y de salmón; y tres muestras de extracto

lipídico de chorizos en diferentes estados de maduración, incluyendo chorizos con lipólisis media, alta y muy alta. La correlación entre los pares de resultados se representó gráficamente (Gráfica 5.2) y pudo constatarse una correlación muy alta (R^2 = 0.996).



Gráfica 5.2: Correlación entre análisis clásico (acidez libre) y análisis RMN.

De forma simila,r se procedió con el índice de yodo. Se trata de un análisis habitual en el control de calidad de aceites y grasas, y sirve para estimar el grado de insaturación, ya que el yodo reacciona con los dobles enlaces. Existen varios métodos para calcular el índice de yodo dependiendo del reactivo de yodo que se aplique. En el método de Wijs, se adiciona una cantidad exacta de cloruro de yodo (ICl) para que reaccione con los dobles enlaces. Posteriormente se añade yoduro potásico (KI) para que el exceso de ICl reaccione formando yodo (I_2), el cual puede ser finalmente valorado frente a tiosulfato sódico ($Na_2S_2O_3$). El resultado se expresa como g de I_2 por 100 g de muestra.

La capacidad de la RMN para discriminar los protones olefínicos del resto y, por tanto, poder estimar el grado de insaturación ya fue propuesta en 1962 en las etapas más tempranas de la técnica.[6] Con posterioridad, la técnica ganó resolución

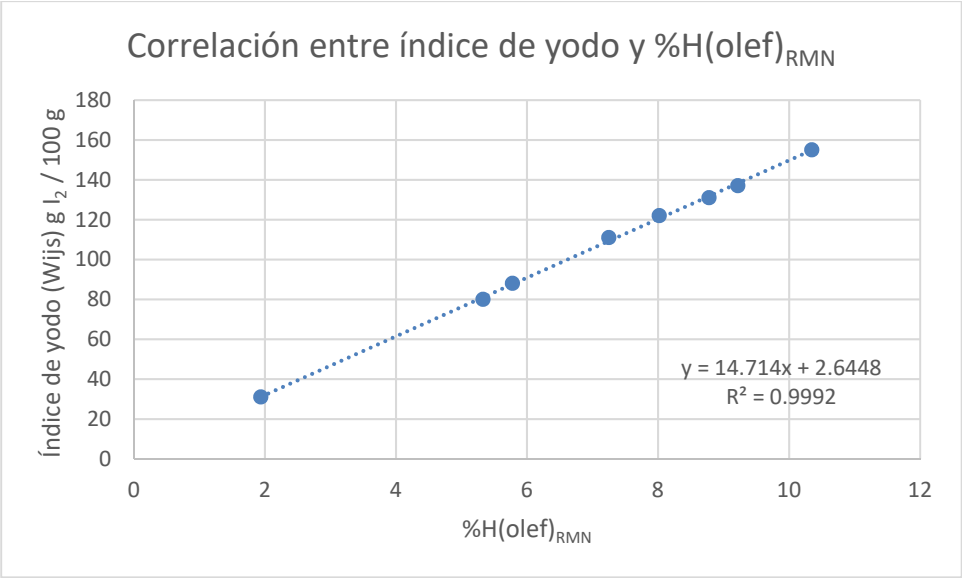
y precisión y se propuso el análisis por RMN como alternativa al costoso método clásico.[7]

En nuestro caso, el grado de insaturación se estimó mediante RMN, de forma sencilla, dividiendo el valor de la integral de la señal de protones olefínicos (**U**) entre la suma de todas las integrales:

$$\%H(olef)_{RMN} = 100 \times (I_U / \Sigma I_x)$$

Con nuestra metodología de análisis RMN, además, la señal **U** puede ser integrada de forma más precisa, ya que, a diferencia del análisis en $CDCl_3$, no existe solapamiento alguno con la señal **T** de glicerol.

Una vez más verificamos la correlación entre los resultados. Para ello, recurrimos a diversos tipos de grasas de diferentes grados de insaturación, como aceites de oliva, girasol, maíz, sésamo, cacahuete y extractos lipídicos de nuez, salmón y mantequilla. Los 8 tipos de grasa fueron analizados a la vez mediante el método clásico (Wijs) y mediante RMN. Los pares de datos fueron representados gráficamente (Gráfica 5.3) y se encontró una correlación muy alta ($R^2 = 0.999$)



Gráfica 5.3: Correlación entre análisis clásico (índice de yodo) y análisis por RMN.

Los anteriores estudios permitir verificar que nuestra metodología de análisis de RMN puede utilizarse como alternativa a los métodos clásicos. Las correlaciones entre ambos métodos son muy altas, con la ventaja de que el análisis RMN requiere de mucho menos gasto de muestra y reactivos, a la vez que es más rápido y eficiente.

Como valor añadido, nuestro procedimiento de análisis, gracias al efecto de la mezcla de disolventes, logra mejorar la definición de las señales implicadas, facilitando la discriminación e integración por separado de las señales $\mathbf{F_a}$ y $\mathbf{F_b}$ en el caso de la acidez libre y de la señal **U** en el caso del índice de yodo.

5.3 EJEMPLO DE APLICACIÓN. MONITORIZACIÓN DE LA DEGRADACIÓN TÉRMICA DE ACEITES

Para terminar de validar nuestra metodología de análisis y para corroborar su utilidad en el análisis y monitorización de la evolución de la fracción grasa, decidimos ponerla a prueba con un experimento rápido de seguimiento de la degradación térmica de aceites. Las ventajas que aporta nuestra mezcla de disolventes deberían permitirnos extraer mucha información de manera sencilla y rápida.

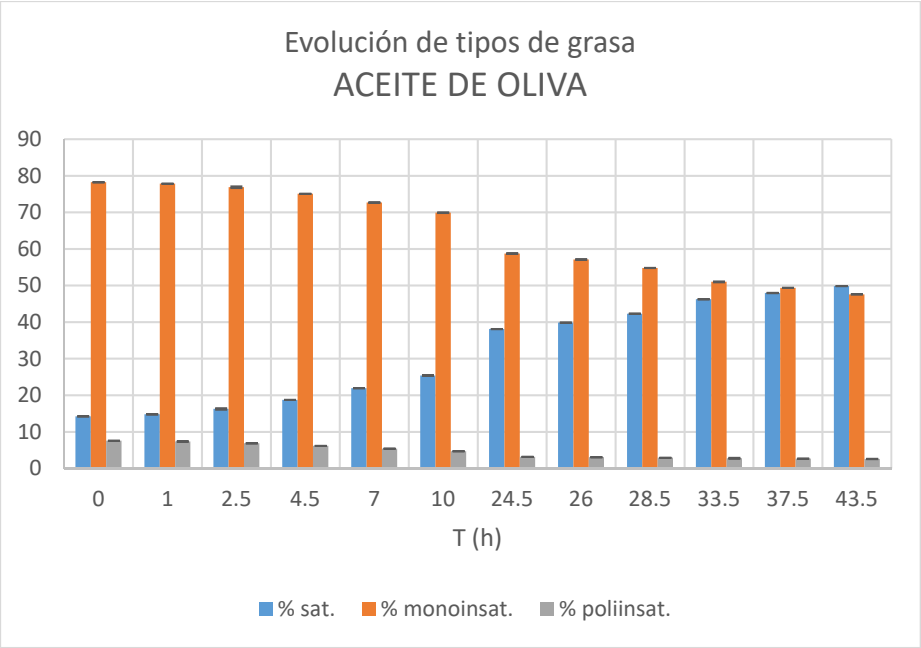
En nuestro experimento de seguimiento de degradación térmica, se calentaron dos tipos diferentes de aceites de cocina (aceite de oliva virgen extra y aceite de girasol, comprados en un supermercado local) a temperaturas de fritura durante un largo periodo de tiempo (más de 40 h). Periódicamente, se extrajeron alícuotas de muestra para su análisis por RMN, utilizando la metodología desarrollada en este trabajo, con la mezcla de disolventes $CS_2/(CD_3)_2SO/CHCl_3$ en proporción [8:2:1].

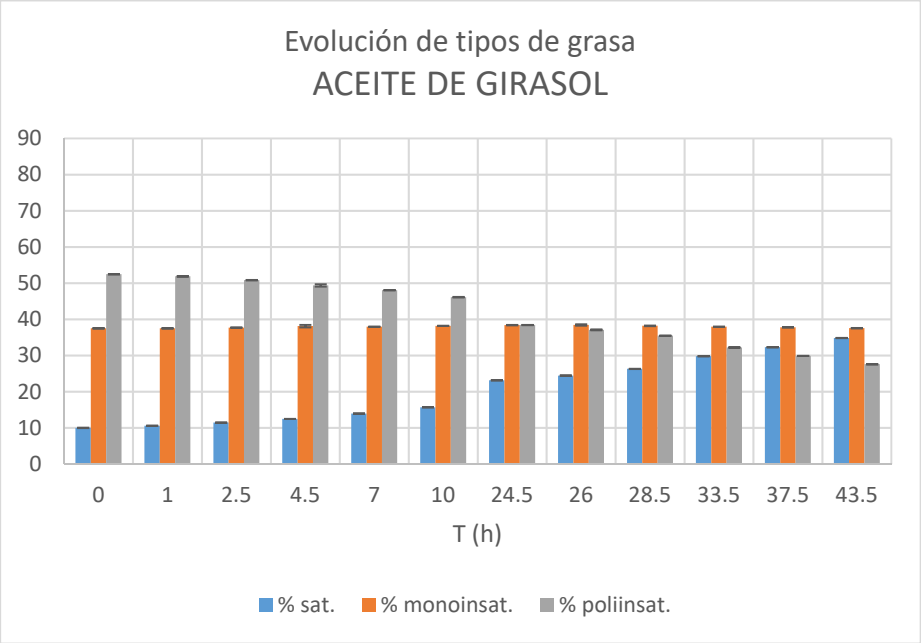
Se pesaron 150 g de cada uno de los aceites en un matraz erlenmeyer de boca ancha de 250 mL. Los matraces conteniendo los aceites se calentaron en placa calefactora con control de temperatura (termostato de lógica difusa, sonda termopar sumergida en el propio aceite) y con sistema de agitación (barra magnética). La temperatura fue ajustada a 160 °C (±5 °C) durante las primeras 24 h y a 190 °C (±5 °C) a lo largo del resto del experimento. Periódicamente, se extrajeron alícuotas de aproximadamente 1 mL y se analizaron por triplicado. En cada tubo se mezclaron 120 mg de aceite con 550 μL del disolvente. Los parámetros de adquisición y el procesado de los espectros fueron los habituales. Los muestreos se realizaron tras 0, 1, 1.5, 2.5, 4.5, 7, 10, 24.5, 26, 28.5, 33.5, 37.5 y 43.5 h.

Las temperaturas de fritura provocan la paulatina descomposición del aceite mediante mecanismos de oxidación, hidrólisis y polimeración.[8] En condiciones de alta temperatura, las grasas poliinsaturadas son más susceptibles de oxidación y descomponen a través de mecanismos con intermedios de peroxidación. Las grasas saturadas, en comparación, son más estables frente a la oxidación en estas condiciones.

Tras nuestro experimento utilizamos los espectros de RMN para estudiar la evolución en la composición de los aceites. Representamos gráficamente los porcentajes de grasa saturada/monoinsaturada/poliinsaturada para su mejor comparación. En las siguientes gráficas puede constatarse claramente cómo decae rápidamente la proporción de polinsaturados (Gráfica 5.4). En el caso de los monoinsaturados observamos dos tendencias diferentes. En aceite de girasol la proporción de monoinsaturados permanece más o menos constante, pues la abundante presencia de poliinsaturados hace que sean éstos últimos los más susceptibles a degradarse. En el caso del aceite de oliva es diferente; la proporción de poliinsaturados de partida es muy pequeña y el tipo de grasa más abundante para ser degradada es la monoinsaturada, que decae progresivamente a lo largo del experimento. Los resultados de nuestro experimento son coherentes con los resultados de estudios similares,[9] lo cual corrobora la validez de nuestro procedimiento de análisis para el estudio de la evolución de grasas.

Durante la degradación térmica también tienen lugar fenómenos de lipólisis. Gracias a nuestra metodología de análisis es posible monitorizar de forma sencilla la evolución de los productos de lipólisis como 1,2-DAG, 1,3-DAG y 1-MAG. En la Figura 5.1 se representa la evolución de las señales características de los productos de lipólisis a lo largo del experimento.





Gráfica 5.4: Evolución de la proporción de tipos de grasa durante el experimento de degradación térmica de aceite de oliva y de girasol.

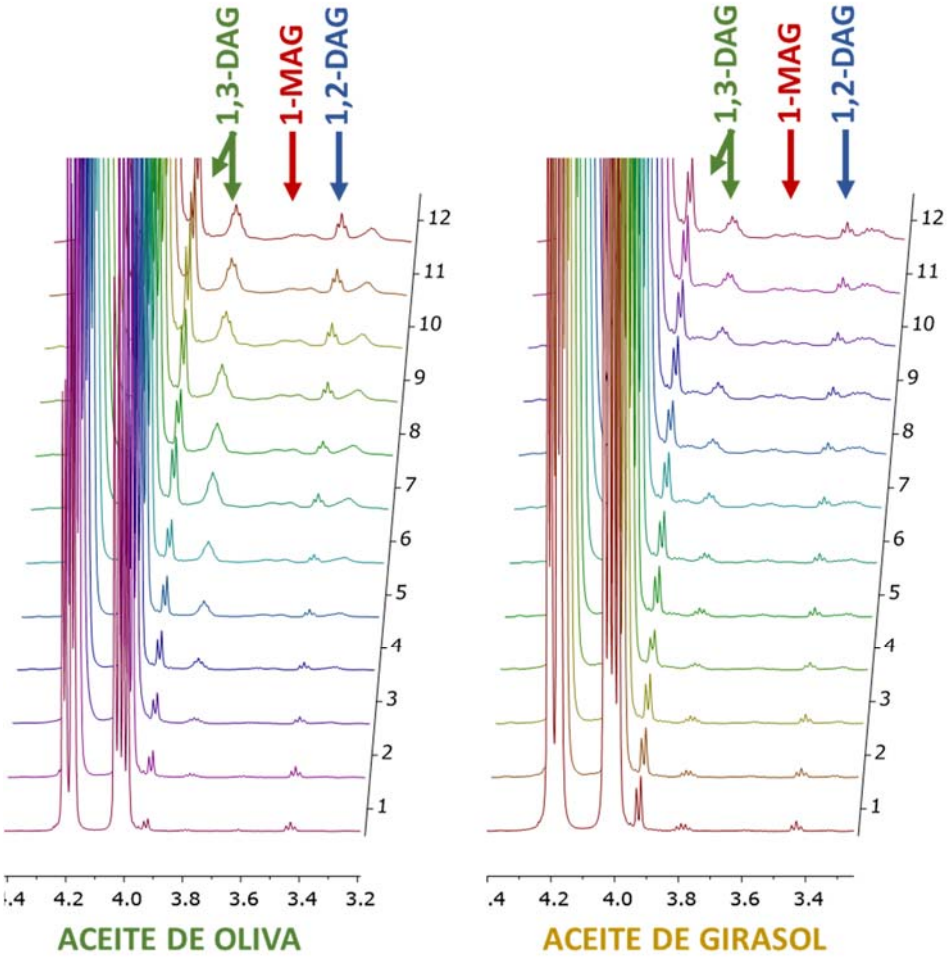
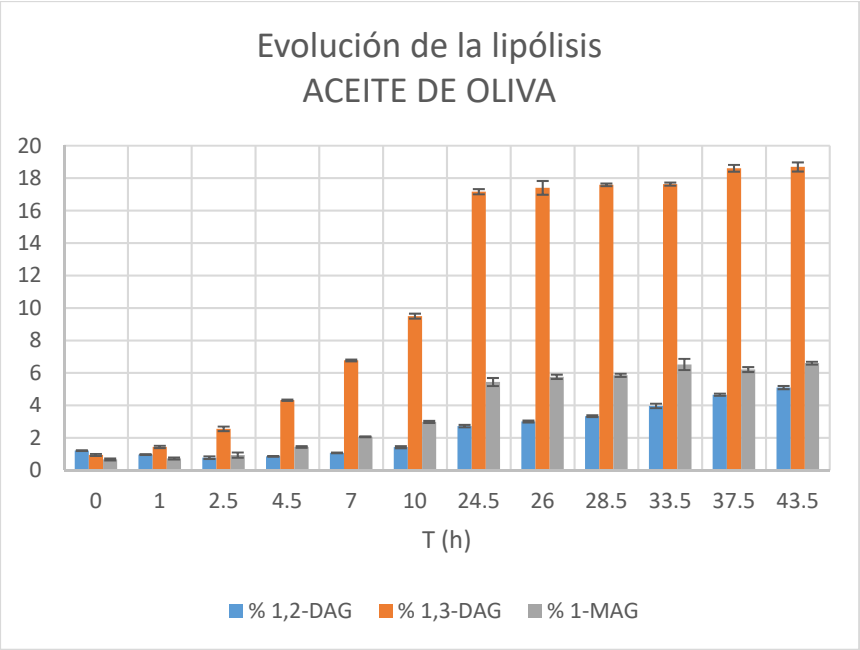
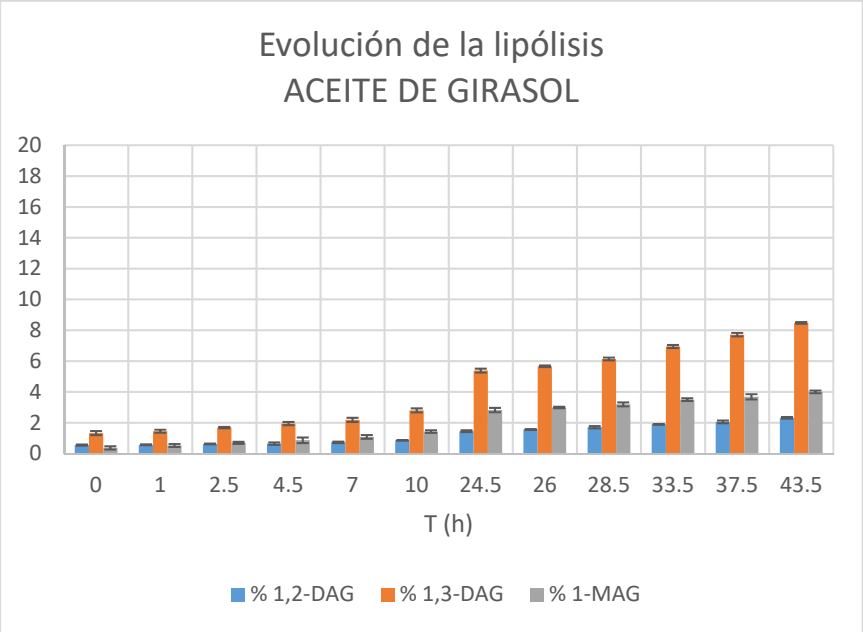


Figura 5.1: Evolución de las señales de protones de glicerol a lo largo del experimento de degradación térmica (de abajo hacia arriba).

El porcentaje de cada una de las especies de lipólisis fue calculado a partir de los datos espectroscópicos y se representó de forma gráfica para poder apreciar la evolución ocurrida (Gráfica 5.1)





Gráfica 5.1: Evolución del porcentaje de productos de lipólisis durante el experimento de degradación térmica de aceite de oliva y de girasol.

Al comparar el comportamiento de ambos aceites pudimos constatar que la presencia de especies de lipólisis en aceite de oliva es mayor que en aceite de girasol.

A modo de observación adicional, a lo largo del experimento no pudimos detectar la señal característica de los ácidos grasos libres **F_a**. Otros autores han observado también que la cantidad de ácidos grasos libres tras experimentos de degradación térmica es muy inferior a la que podría esperarse en comparación al avance de la lipólisis.[10] A modo de hipótesis, proponemos que es probable que en condiciones de alta temperatura los ácidos grasos libres descompongan más rápido que las formas esterificadas.

La conclusión de este estudio es muy satisfactoria. Nuestra metodología de análisis es sencilla, rápida y robusta; muy práctica y útil para el estudio de las grasas, desde el punto de vista composicional de componentes mayoritarios (saturado, insaturado) como de minoritarios (MAG, DAG).

Tras las etapas de optimización y validación, la nueva metodología de análisis está lista para su aplicación en el análisis de los embutidos. En primer lugar, se aplicó en la monitorización intensiva a lo largo de todo el proceso de elaboración de embutido. Posteriormente, y a modo de herramienta de innovación, también fue aplicada al seguimiento de los efectos provocados por diferentes cambios en la formulación.

5.4 BIBLIOGRAFÍA

(1) Bharti, S. K.; Roy, R. Quantitative ^{1}H NMR Spectroscopy. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **2012**, *35*, 5–26.

(2) Malz, F.; Jancke, H. Validation of Quantitative NMR. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2005**, *38*, 813–823.

(3) Satyarthi, J. K.; Srinivas, D.; Ratnasamy, P. Estimation of Free Fatty Acid Content in Oils, Fats, and Biodiesel by ^{1}H NMR Spectroscopy. *Energy and Fuels* **2009**, *23* (4), 2273–2277.

(4) Skiera, C.; Steliopoulos, P.; Kuballa, T.; Holzgrabe, U.; Diehl, B. Determination of Free Fatty Acids in Edible Oils by ^{1}H NMR Spectroscopy. *Lipid Technol.* **2012**, *24* (12), 279–281.

(5) Skiera, C.; Steliopoulos, P.; Kuballa, T.; Diehl, B.; Holzgrabe, U. Determination of Free Fatty Acids in Pharmaceutical Lipids by ^{1}H NMR and Comparison with the Classical Acid Value. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2014**, *93*, 43–50.

(6) Johnson, L. F.; Shoolery, J. N. Determination of Unsaturation and Average Molecular Weight of Natural Fats by Nuclear Magnetic Resonance. *Anal. Chem.* **1962**, *34* (9), 1136–1139.

(7) Miyake, Y.; Yokomizo, K.; Matsuzaki, N. Rapid Determination of Iodine Value by ^{1}H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1998**, *75* (1), 15–19.

(8) Choe, E.; Min, D. B. Chemistry of Deep-Fat Frying Oils. *J. Food Sci.* **2007**, *72* (5), R77–R86.

(9) Guillén, M. D.; Ruiz, A. Monitoring of Heat-Induced Degradation of Edible Oils by Proton NMR. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2008**, *110* (1), 52–60.

(10) Lucas-Torres, C.; Pérez, Á.; Cabañas, B.; Moreno, A. Study by ^{31}P NMR Spectroscopy of the Triacylglycerol Degradation Processes in Olive Oil with Different Heat-Transfer Mechanisms. *Food Chem.* **2014**, *165* (0), 21–28.

CAPÍTULO 6
ANÁLISIS DE EMBUTIDOS POR RMN

Contenido

6.1 ESTUDIO DE UN CICLO DE MADURACIÓN-SECADO DE EMBUTIDO 157
6.2 EFECTO DEL CAMBIO DE INGREDIENTES 161
6.3 EFECTO DEL CAMBIO DE MATERIA PRIMA CÁRNICA 168
6.4 DIFERENCIACIÓN DE MUESTRAS MEDIANTE PCA 171
6.5 BIBLIOGRAFÍA 178

"Siempre estoy haciendo lo que no puedo hacer,
para poder aprender cómo hacerlo"

Pablo Picasso

6.1 ESTUDIO DE UN CICLO DE MADURACIÓN-SECADO DE EMBUTIDO

El proceso de elaboración de un embutido como el chorizo comienza con el picado de las materias primas cárnicas. A continuación, se añaden el resto de ingredientes, sal, ajo y pimentón; y se mezclan en la amasadora. Tras reposar unas horas, la masa es embutida en la tripa.Después, el chorizo fresco es colgado en barras y trasladado a secadero, donde durante unas semanas será sometido a lenta deshidratación. Tras la finalización del proceso de maduración-secado, el producto es envasado en bolsa de plástico con atmósfera modificada (mezclas de N_2 y CO_2) y conservado en refrigeración.

En nuestro estudio se llevó a cabo el seguimiento de un lote de fabricación desde el primer día y a lo largo de 15 semanas, tratando de cubrir todas las etapas: materias primas, elaboración, secado y conservación. Los análisis de RMN se realizaron por triplicado a partir de muestras recogidas en los días 0 (día de elaboración), 1, 5, 7, 11, 14, 21, 33, 49 y 104. Se realizaron muestreos frecuentes en las primeras semanas del proceso (entre el día 0 y el día 21), por ser las de mayor transformación, y muestreos más espaciados durante la etapa de conservación (día 33 hasta día 104).

Los estudios se llevaron a cabo sobre muestras provenientes de condiciones reales de producción industrial. Para este fin, se contó con la colaboración de Embutidos Luis Gil. Gracias a su apoyo, pudimos tener acceso a sus instalaciones y realizar todos los muestreos necesarios (Imagen 6.1).

Imagen 6.1: Instalaciones y ganadería de Embutidos Luis Gil

Gracias a la versatilidad de la RMN, pudimos analizar la composición en ácidos grasos y a la vez hacer un seguimiento de la lipólisis, a través del análisis de mono- y diglicéridos (MAG y DAG), y de ácidos grasos libres. Es interesante destacar que existen pocos precedentes de estudios en embutido donde se analicen los DAG y MAG y ninguno por RMN.[1–3] Narváez-Rivas y colaboradores monitorizaron la evolución de los diglicéridos a lo largo de todo el ciclo de maduración para un producto cárnico con ciertas similitudes como es el jamón ibérico.[4] En embutidos como el chorizo, es más habitual llevar a cabo el seguimiento de la lipólisis a través de medidas de acidez libre.[5]

Las señales mayoritarias (indicadoras de composición) no experimentan variaciones significativas a lo largo de todo el ciclo. Sin embargo, sí se aprecian variaciones en las señales minoritarias características de los metabolitos de la lipólisis. En la siguiente Figura 6.1 puede apreciarse cómo aumentan las señales correspondientes a los diglicéridos y a los ácidos grasos libres a lo largo de la evolución del embutido.

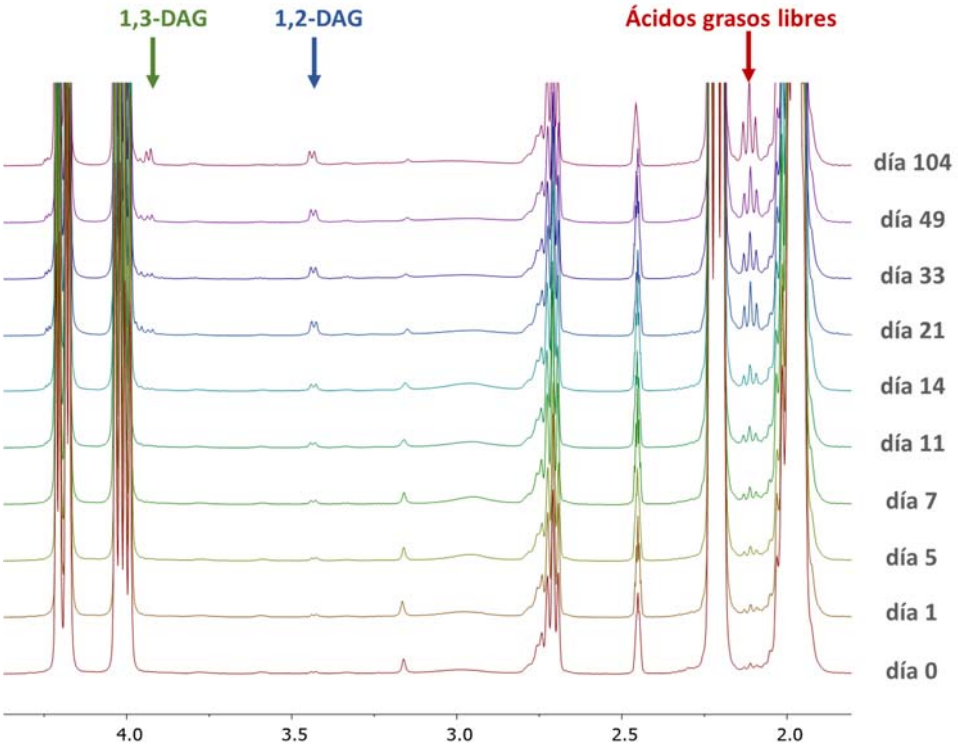
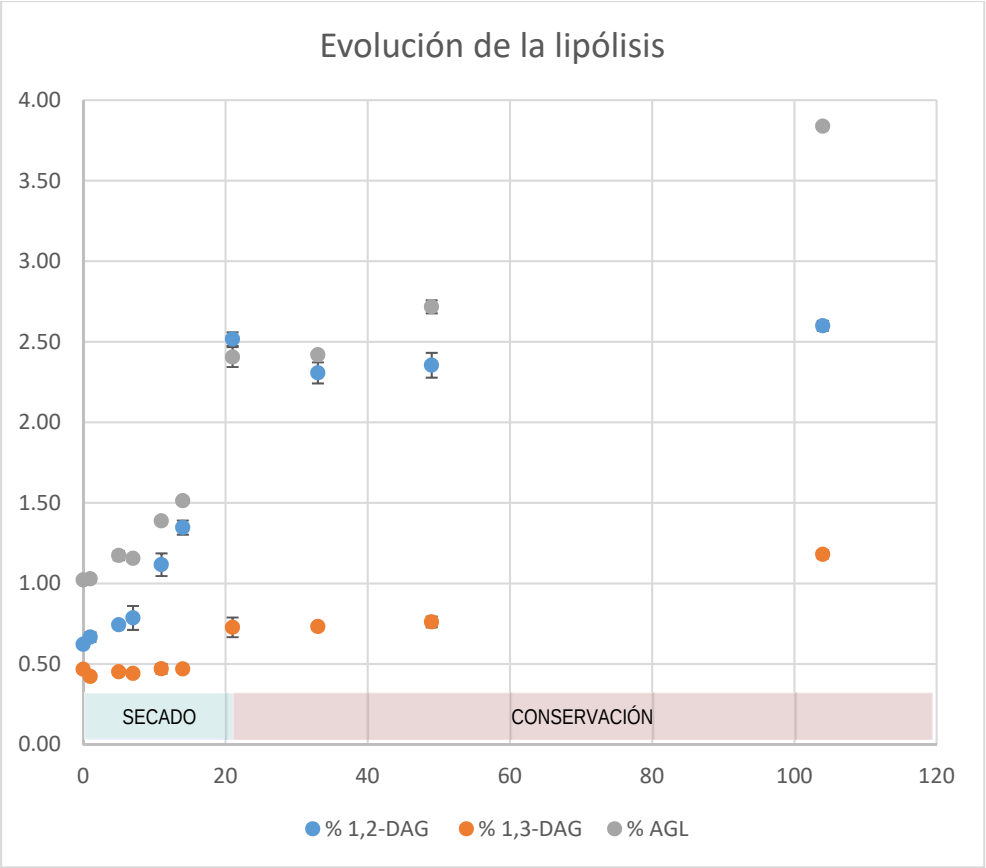


Figura 6.1: Representación de los espectros de RMN de los extractos lipídicos de chorizo a lo largo del ciclo de maduración-secado y conservación.

A partir de los datos de las integraciones de las diferentes señales y aplicando las fórmulas de cálculo anteriormente descritas, obtuvimos los valores de porcentaje de 1,2-DAG, 1,3-DAG, y ácidos grasos libres (AGL). Desafortunadamente, para 1-MAG la relación señal/ruido es muy pequeña y los valores calculados presentan una dispersión muy alta lo que ha provocado que no hayan sido considerados en este estudio. La representación gráfica de los datos de 1,2-DAG, 1,3-DAG y AGL genera una gráfica que se presenta a continuación (Gráfica 6. 1).



Gráfica 6. 1 Representación de la evolución del contenido en 1,2-DAG, 1,3-DAG y AGL a lo largo de los días de muestreo.

A la vista de la gráfica, puede apreciarse un ascenso progresivo de los 1,2-DAG en los 21 primeros días (fase de maduración-secado), seguida de una estabilización. Para los 1,3-DAG y los AGL también puede apreciarse una cierta deceleración a partir del día 21, pero no tan acusada como con los 1,2-DAG. Estas observaciones están de acuerdo con otros estudios que utilizan análisis cromatográfico,[2] donde se aprecia la rápida formación de 1,2-DAG en las primeras etapas y un crecimiento progresivo de 1,3-DAG en las etapas posteriores, incrementándose la ratio 1,3-DAG/1,2-DAG, mientras la evolución de AGL permanece en progresión. Por otro lado, el punto de inflexión detectado en el día 21 puede estar también relacionado

con el cambio radical de condiciones que sufre el producto al pasar de secadero (18° C, atmósfera con O_2) a conservación en bolsa (3° C, atmósfera inerte)

Un modelo de lipólisis que describiría lo observado sería el siguiente: la ruptura del primer ácido graso del triglicérido origina, principalmente 1,2-DAG, posiblemente por la estereoespecificidad de las lipasas presentes. El 1,2-DAG, más abundante al principio, puede isomerizar a 1,3-DAG (termodinámicamente favorecido) de forma análoga a como ocurre en el caso de los aceites.[6–8] Este último diglicérido puede perder el siguiente ácido graso y originar 1-MAG, el cual es menos estable y por eso rápidamente sufre la pérdida del ácido graso restante, completando así la hidrólisis total a glicerol más tres moléculas de ácido graso. De acuerdo a este modelo, los 1,2-DAG actúan como especies intermedias (por ello dejan de crecer y se estabilizan) dentro de un mecanismo de generación constante de ácidos grasos libres.

6.2 EFECTO DEL CAMBIO DE INGREDIENTES

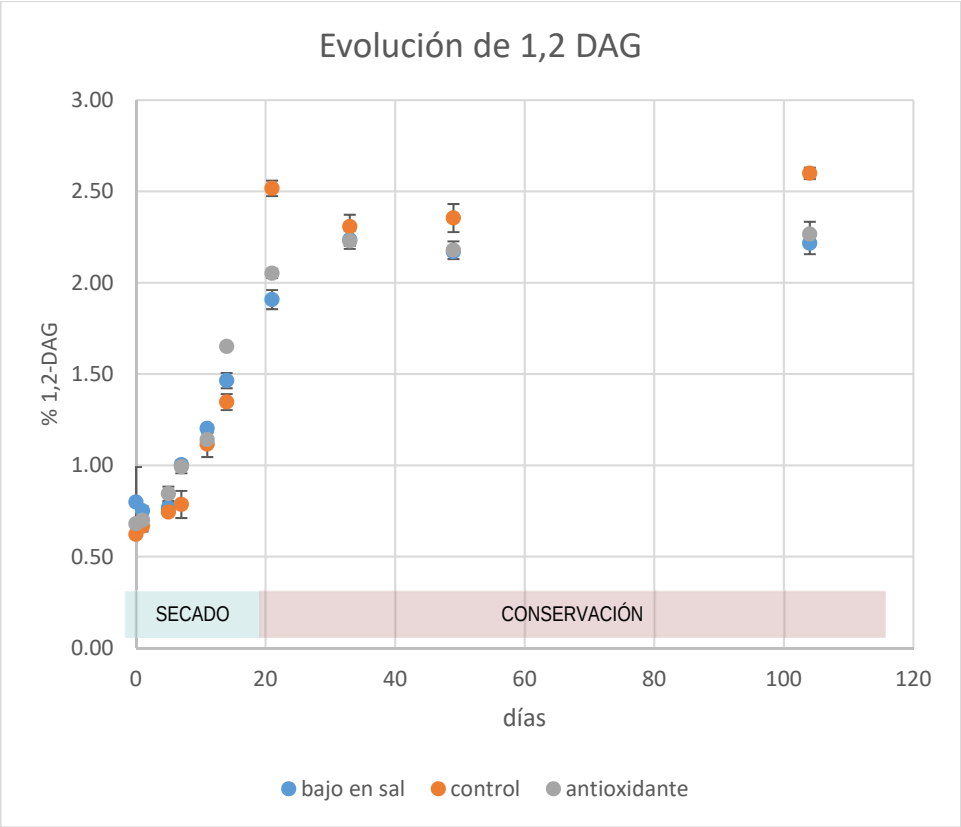
Gracias a la sencillez de la técnica y a la gran cantidad de información que es capaz de aportar, el análisis por RMN tiene un enorme potencial como herramienta para realizar el seguimiento de los efectos que pueden llegar a causar ciertos cambios en la formulación o el proceso. Para ello, y a modo de validación de la técnica, fueron elaborados lotes experimentales que incluían alguna modificación respecto a la fórmula original como: menor porcentaje de sal añadida o incorporación de un ingrediente antioxidante. Los lotes experimentales pudieron ser realizados gracias, de nuevo, a la inestimable ayuda de la empresa Embutidos Luis Gil.

Se elaboraron dos lotes experimentales y un lote control frente al que comparar. El primer lote experimental contiene una cantidad reducida de sal (2%, un 33% menos de lo habitual). La sal afecta al equilibrio osmótico y la fuerza iónica. La sal puede influir en el desarrollo microbiológico y repercutir en la fermentación. Asimismo, la sal tiene un cierto efecto pro-oxidante en el embutido.[9] Comparando su evolución frente a un lote control se podrían constatar los efectos de este cambio en la formulación.

Al segundo lote experimental se le añadió un extracto natural antioxidante de té verde (Plant-Ex Ingredients Ltd.). Se eligió este extracto porque no introduce excesivos aromas ni cambios de color al producto. Numerosos extractos naturales poseen la capacidad de inhibir fenómenos oxidativos en carnes y productos cárnicos.[10] En nuestro estudio trataremos de comprobar si también ejercen algún tipo de efecto sobre el desarrollo de la lipólisis.

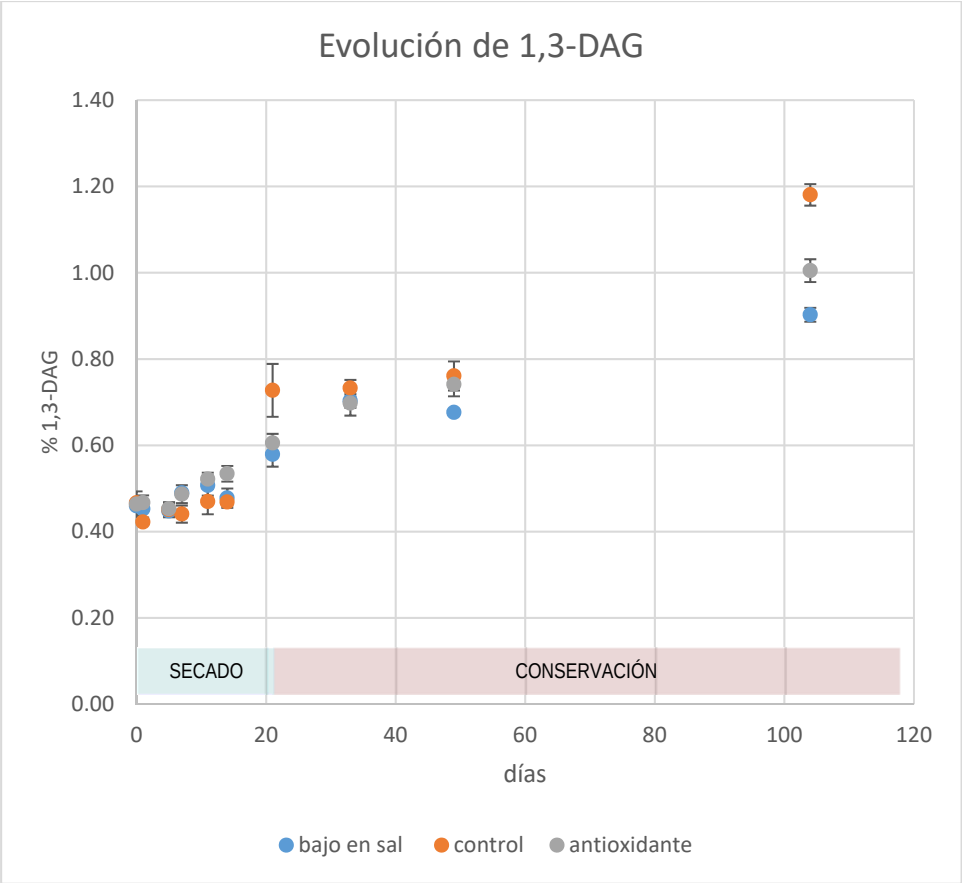
Ambos lotes experimentales, junto a un lote control, se elaboraron el mismo día y se maduraron en el mismo secadero durante todo el ciclo. A lo largo de los días 0, 1, 5, 7, 11, 14, 21, 33, 49 y 104 se recogieron muestras de cada lote y se analizaron por triplicado. Los resultados de los análisis fueron comparados.

A continuación, se incluyen las gráficas de la evolución a lo largo de todo el ciclo de los metabolitos de lipólisis 1,2-DAG (Gráfica 6.2), 1,3-DAG (Gráfica 6.3), 1-MAG (Gráfica 6.4) y AGL (Gráfica 6.5) para los tres lotes.



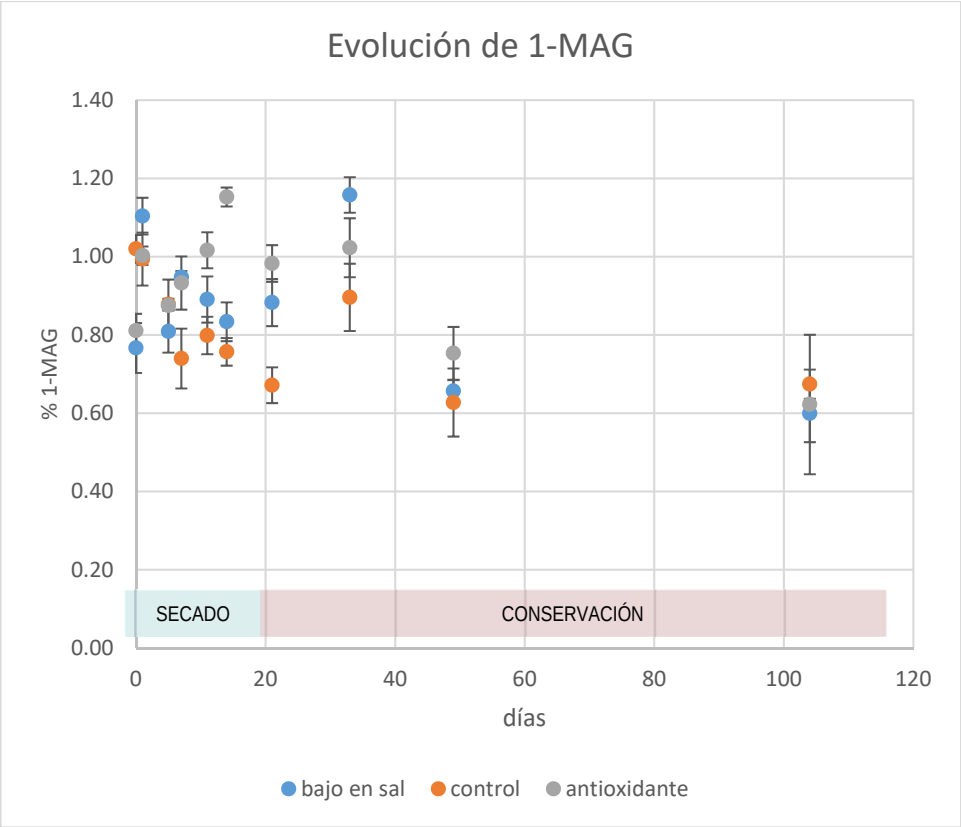
Gráfica 6.2: Comparación de la evolución del contenido en 1,2-DAG en muestras con diferente composición.

En la evolución del contenido en 1,2-DAG pudo apreciarse, al igual que durante la monitorización del ciclo, una deceleración importante y posterior estabilización a partir del día 21 (inicio de envasado). No se apreciaron grandes diferencias entre los tres lotes a comparar. Durante las primeras semanas el lote control mostró un poquito menos de lipólisis aunque esta tendencia se invirtió a partir del día 21.



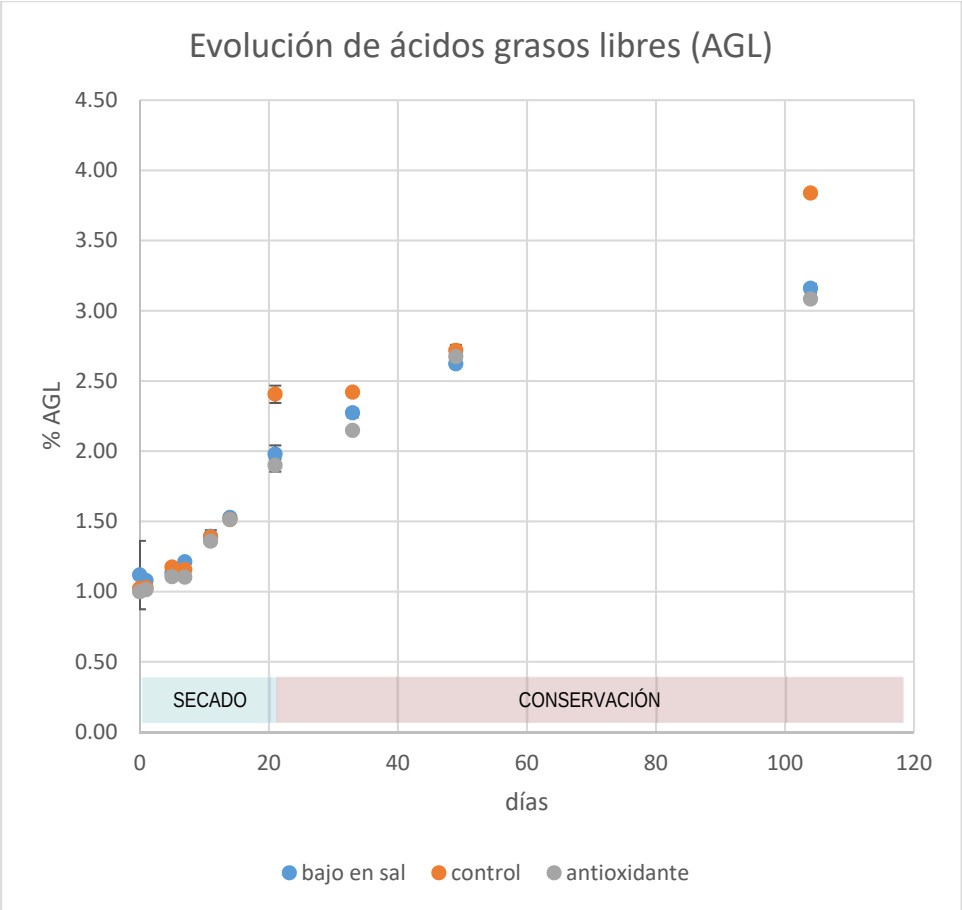
Gráfica 6.3: Comparación de la evolución del contenido en 1,3-DAG en muestras con diferente composición.

La gráfica de la evolución de los 1,3-DAG presenta una tendencia comparable a la del estudio previo de monitorización, con un ascenso más o menos progresivo. Nuevamente, se observa el mismo efecto que en el caso de los 1,2-DAG, y durante los 21 primeros días el lote control mostró unos valores un poco más bajos y durante la etapa de conservación unos valores un poco mayores.



Gráfica 6.4: Comparación de la evolución del contenido en 1-MAG en muestras con diferente composición.

La señal de los 1-MAG es relativamente pequeña e introduce un error considerable en el cálculo, lo cual dificulta la comparación entre los diferentes lotes. Los valores de 1-MAG son pequeños, en general, y permanecen más o menos constantes a lo largo de todo el proceso.



Gráfica 6.5: Comparación de la evolución del contenido en AGL en muestras con diferente composición.

Por último, la evolución de los AGL mostró un crecimiento más o menos progresivo, en línea con lo ya observado durante la monitorización del ciclo completo. Nuevamente, los valores son muy similares para los tres lotes, aunque para el lote control la lipólisis es mayor a partir del día 21.

En general, los valores obtenidos para los tres lotes fueron muy similares. La única diferencia apreciable consistió en valores más altos para el lote control en los muestreos a partir del día del envasado. La evolución de la lipólisis discurrió de manera similar para los tres lotes, aunque fue más alta en el lote control.

A la vista de estos datos, se puede deducir que cambios menores en la composición del producto como la reducción de sal o la adición de antioxidantes tienen un efecto relativamente pequeño sobre la evolución de la lipólisis, sobre todo durante las primeras semanas del proceso.

También quisimos comparar el desarrollo de los fenómenos oxidativos en los tres lotes. El seguimiento nos resultó un tanto difícil, pues las señales de sustancias indicadoras de la oxidación como, por ejemplo, los aldehídos, fueron muy pequeñas. Tan sólo fueron detectables en las muestras del día 104 y con relaciones señal/ruido muy bajas. En la Figura 6.2 se compara la señal propia de los aldehídos para cada uno de los lotes. Aunque las señales son tan pequeñas que no permiten una estimación cuantitativa, sí que permite apreciar, al menos cualitativamente, que existe un efecto por parte del extracto antioxidante y que en el lote bajo en sal podría notarse una disminución del efecto pro-oxidante de la sal.

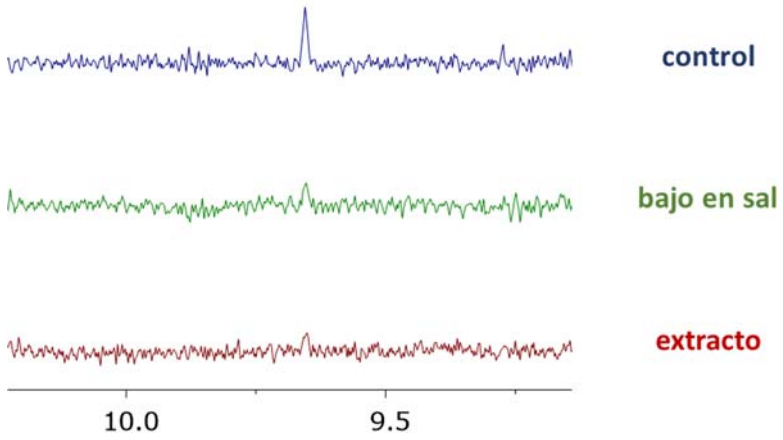


Figura 6.2: Comparación de la intensidad de la señal de aldehído en muestras del día 104.

En resumen, pequeñas diferencias en formulación como la reducción parcial de sal o la incorporación de extractos antioxidantes tienen un efecto muy pequeño en el desarrollo de la lipólisis durante el proceso de maduración-secado del chorizo. Ha quedado demostrado que la RMN puede ser aplicada de forma sencilla al análisis

de embutido y que permite la obtención de mucha información del proceso de elaboración del embutido.

6.3 EFECTO DEL CAMBIO DE MATERIA PRIMA CÁRNICA

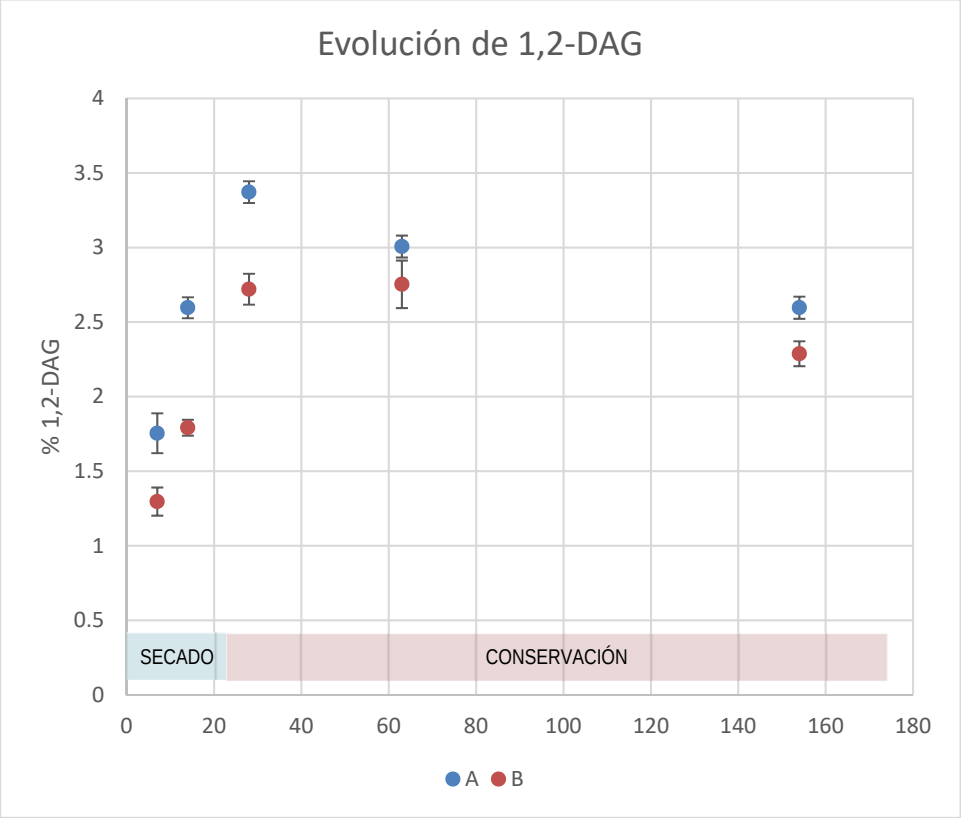
Se llevó a cabo un estudio de seguimiento similar al anterior pero centrado, esta vez, en el efecto que puedan tener modificaciones mayores en la composición. En este caso se compararon dos lotes de chorizos elaborados con materias primas cárnicas provenientes de cerdos de diferente raza y alimentados mediante diferente dieta. Trabajos previos han estudiado el efecto de la raza y la alimentación en la calidad de la carne[11] y en las características de los productos cárnicos.[12]

La composición de la grasa de los dos lotes **A** y **B** fue analizada al principio del proceso mediante RMN y se obtuvieron los resultados representados en la Tabla 6.1. En comparación, la materia prima cárnica del lote **B** contiene un menor porcentaje de grasas saturadas y un mayor porcentaje de grasas di-insaturadas.

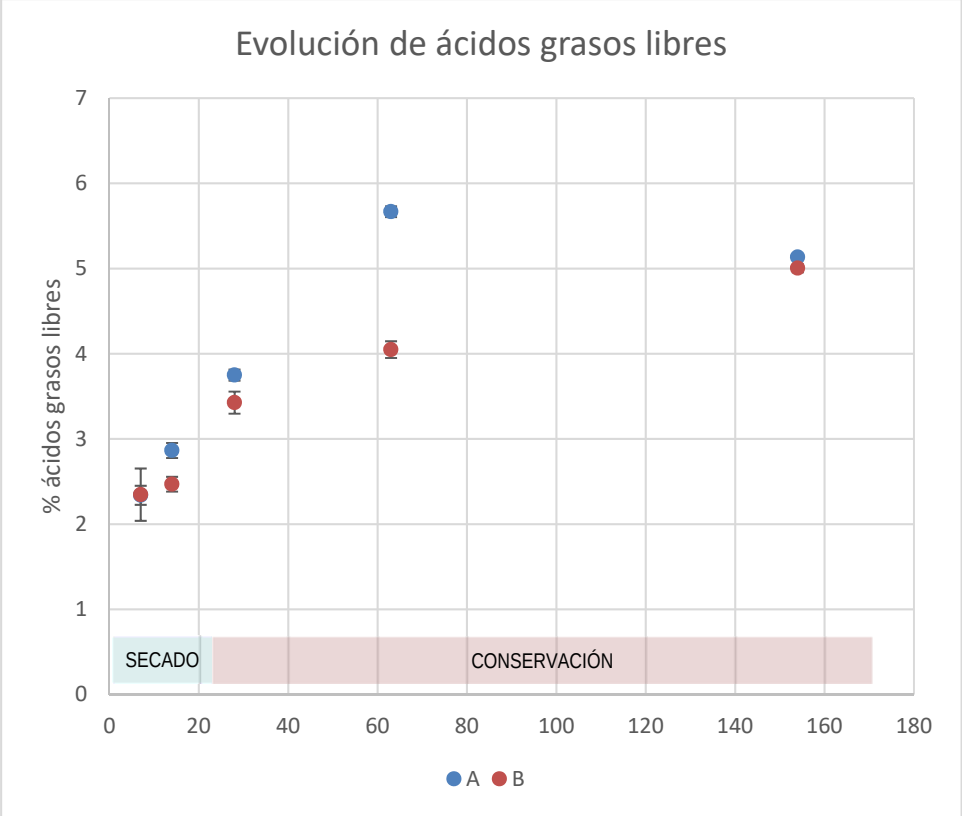
Tabla 6.1: Composición de la grasa de los dos lotes de chorizo elaborados con diferente materia prima cárnica.

GRASA	A	B
% grasa saturada	**42.1**	**35.4**
% grasa insaturada	**57.9**	**64.6**
% oleico	47.6	45.5
% linoleico	8.2	16.7
% linolénico	2.1	2.4

Para sendos lotes, se realizaron análisis en los días 7, 14, 28, 63 y 153 a partir de su elaboración. A continuación, se representó gráficamente la evolución de los 1,2-DAG (Gráfica 6.6) y de los ácidos grasos libres (Gráfica 6.7), como principales indicadores de la evolución de la lipólisis.



Gráfica 6.6: Comparación de la evolución del contenido en 1,2-DAG en lotes a partir de diferente materia prima cárnica.



Gráfica 6.7: Comparación de la evolución del contenido de AGL en lotes a partir de diferente materia prima cárnica.

Al observar la evolución de los dos indicadores en las gráficas pudo apreciarse que en el caso de los 1,2-DAG se volvió a producir la típica deceleración en el crecimiento a partir del inicio de la conservación. Para los AGL, sin embargo, la progresión es más constante. Durante este experimento, a diferencia del caso anterior, pudieron apreciarse diferencias algo mayores en la evolución de la lipólisis de ambos lotes y desde tiempos de proceso más tempranos.

El efecto de la naturaleza de la materia prima cárnica, es decir, las características composicionales de la grasa, afectan de manera más cierta al posterior desarrollo de los fenómenos de lipólisis que los pequeños cambios en formulación.

En definitiva, nuestra metodología de análisis mediante RMN ha demostrado ser una buena herramienta de análisis y control de embutidos, muy útil y versátil a la hora de monitorizar los efectos de la introducción de cambios o innovaciones en el proceso de elaboración.

Conviene destacar que los análisis han sido realizados sobre embutidos elaborados en condiciones reales, confirmando que la técnica ya está lista para ser aprovechada por aquellas empresas que lo demanden. Este estudio es, de hecho, el punto de partida de futuros proyectos que profundizarán en el aprovechamiento del potencial analítico que la herramienta ha demostrado.

6.4 DIFERENCIACIÓN DE MUESTRAS MEDIANTE PCA

La RMN es una herramienta muy útil en el estudio de la metabolómica y hasta el momento hemos podido constatar su potencial en el análisis dirigido (*targeted*) aplicado a embutidos y grasas. Pero las señales del espectro de RMN también son un punto de partida muy interesante, desde el punto de vista quimiométrico, para los estudios de análisis no dirigido (*untargeted*). Uno de los estudios quimiométricos no supervisados más habituales es el análisis de componentes principales (PCA).

PCA es un método estadístico muy útil para reducir el número de variables. Las muestras con muchos individuos y muchas variables originan espacios muestrales con tantas dimensiones como variables. Mediante PCA se puede encontrar un número pequeño de variables latentes, conocidas como componentes principales, que logran explicar, aproximadamente, toda la varianza de las variables originales. Es decir, el PCA permite simplificar la complejidad de espacios muestrales de múltiples dimensiones a la vez que conserva la información. Ello facilita enormemente la representación de los datos de una forma muy visual y muy simplificada. Esta característica es muy útil a la hora de comparar y agrupar los datos.

El PCA puede ser aplicado sobre los datos concretos extraídos del espectro (concentraciones, integrales, etc.) o puede aplicarse de forma global sobre todo el

espectro. Los espectros de RMN son el resultado de una digitalización y son, por tanto, un conjunto de datos. Lamentable, el número de datos que componen cada espectro es de un tamaño demasiado grande (32000) como para resultar operativo. Para solventar esta limitación se utilizan estrategias de procesamiento de datos como paso previo a la aplicación del PCA.[13]

Algunos tipos de software como MNova incorporan la posibilidad de realizar el procesamiento previo de datos y el consiguiente PCA. En nuestro estudio, decidimos utilizar esta opción por su simplicidad y accesibilidad.

El primer paso previo a la realización del estudio quimiométrico consiste en homogeneizar apropiadamente los espectros a tratar. Deben ser alineados respecto al desplazamiento de la referencia externa (0 ppm para la señal de TMS, generalmente) y deben ser convenientemente ajustados en fase y en corrección de línea base. Posteriormente, el conjunto de espectros a tratar es apilado y se aplican las herramientas de procesado de datos. En primer lugar, se realiza el *binning* o compartimentación que consiste en dividir el espectro en un número definido de *bins* o porciones de una anchura, típicamente, de 0.1 ppm o de 0.05 ppm. A cada *bin* se le asigna el valor del área bajo la curva de señal. En la práctica, es una forma de reducir el número de datos sin perder información. Al nuevo conjunto de datos se le pueden aplicar filtros de limpieza de datos para, por ejemplo, prescindir de los *bins* con valor igual a cero. También es conveniente aplicar herramientas de normalización sobre los datos para que las muestras sean más comparables entre sí. La normalización, por ejemplo, evita las diferencias causadas por la variabilidad en la concentración de la muestra. Finalmente, se aplican funciones de escalado, que consisten en técnicas estadísticas que ayudan a que la distribución de los datos sea más normal, esto es, que las variaciones en metabolitos minoritarios tengan un peso similar a las variaciones en los metabolitos mayoritarios aunque éstos sean varios órdenes de magnitud mayores. De esta forma, la matriz de datos quedaría lista para su procesado mediante PCA.

Quisimos comprobar si el PCA era eficaz discriminando muestras de embutido de diferente materia prima cárnica. Aprovechamos los espectros del estudio de la evolución de los lotes A y B y los comparamos. Se prepararon y apilaron los espectros correspondientes a los días 7, 14, 28, 63 y 153 para los lotes A y B. Los espectros correspondientes al lote A se colorearon de azul y los de B en rojo. Los parámetros de procesado se representan en la Figura 6.3.

Binning	
Método	Average Sum
Ancho del bin	0.4 ppm
Comprobación de integridad de datos	true
Filtrado	
Normalización	
Método	Sum
Escalando	
Método	Pareto

Figura 6.3: Parámetros de procesado en el PCA de diferenciación de embutidos.

Por el método de prueba y error se fue refinando la zona del espectro más útil para lograr discriminar nuestras muestras, que en nuestro caso resultó ser la comprendida entre 2.5 y 5.5 ppm (Figura 6.4).

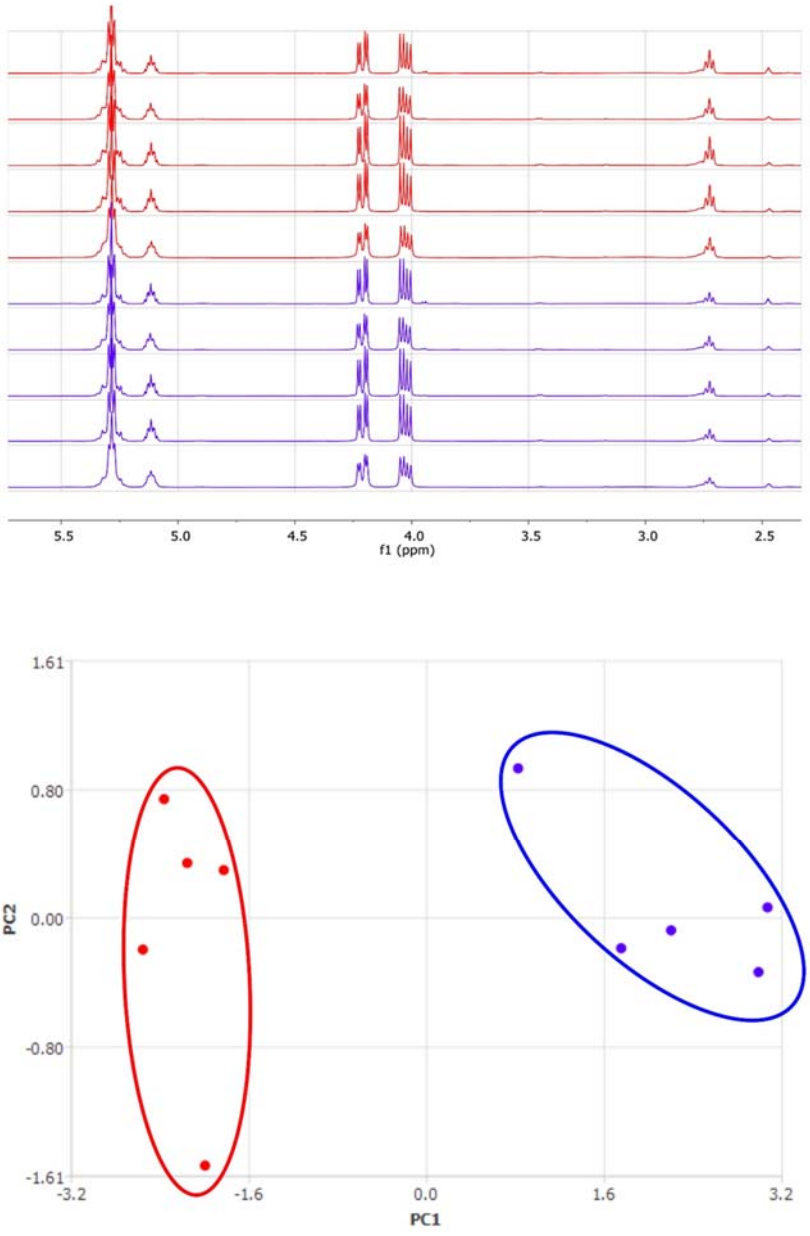


Figura 6.4: Espectros apilados de los lotes A y B a lo largo de los días 7, 14, 28, 63 y 153 y score plot *tras PCA.*

Puede comprobarse cómo el PCA distingue perfectamente entre los dos lotes A y B, y agrupa las muestras de cada lote a ambos lados de la gráfica, con independencia del grado de avance en la maduración-conservación.

En línea con este estudio, nos propusimos comprobar si el PCA era capaz de distinguir entre muestras con diferentes tiempos de evolución en su maduración-secado. Para este estudio, utilizamos los espectros de los lotes anteriormente utilizados para evaluar el efecto del cambio de ingredientes; lote control, lote bajo en sal y lote con extracto antioxidante. Estos tres lotes fueron elaborados a partir de la misma materia prima cárnica y por ello su composición es muy similar. Las diferencias de concentración de sal o de presencia del extracto son relativamente pequeñas en comparación con las diferencias aportadas por materias primas cárnicas de diferente composición.

Se prepararon y apilaron los espectros correspondientes a los días 1, 7, 21, y 49 para los lotes control, bajo en sal y con extracto antioxidante. Los espectros correspondientes al día 1 se colorearon de azul, los del día 7 de rojo, los del día 21 de amarillo y los del día 49 de violeta. Para el procesado de datos se utilizaron los parámetros de la Figura 6.5:

Binning	
Método	Average Sum
Ancho del bin	0.1 ppm
Comprobación de integridad de datos	true
Filtrado	
Normalización	
Método	Sum
Escalando	
Método	Range

Figura 6.5: Parámetros de procesado en el PCA de diferenciación de etapas.

Por el método de prueba y error se fue refinando la zona del espectro más útil para lograr discriminar las muestras, que en nuestro caso resultó ser la unión de las zonas comprendidas entre 0.5 y 2.8 ppm; entre 3.3 y 4.4 ppm y entre 4.8 y 5.5 ppm (Figura 6.6).

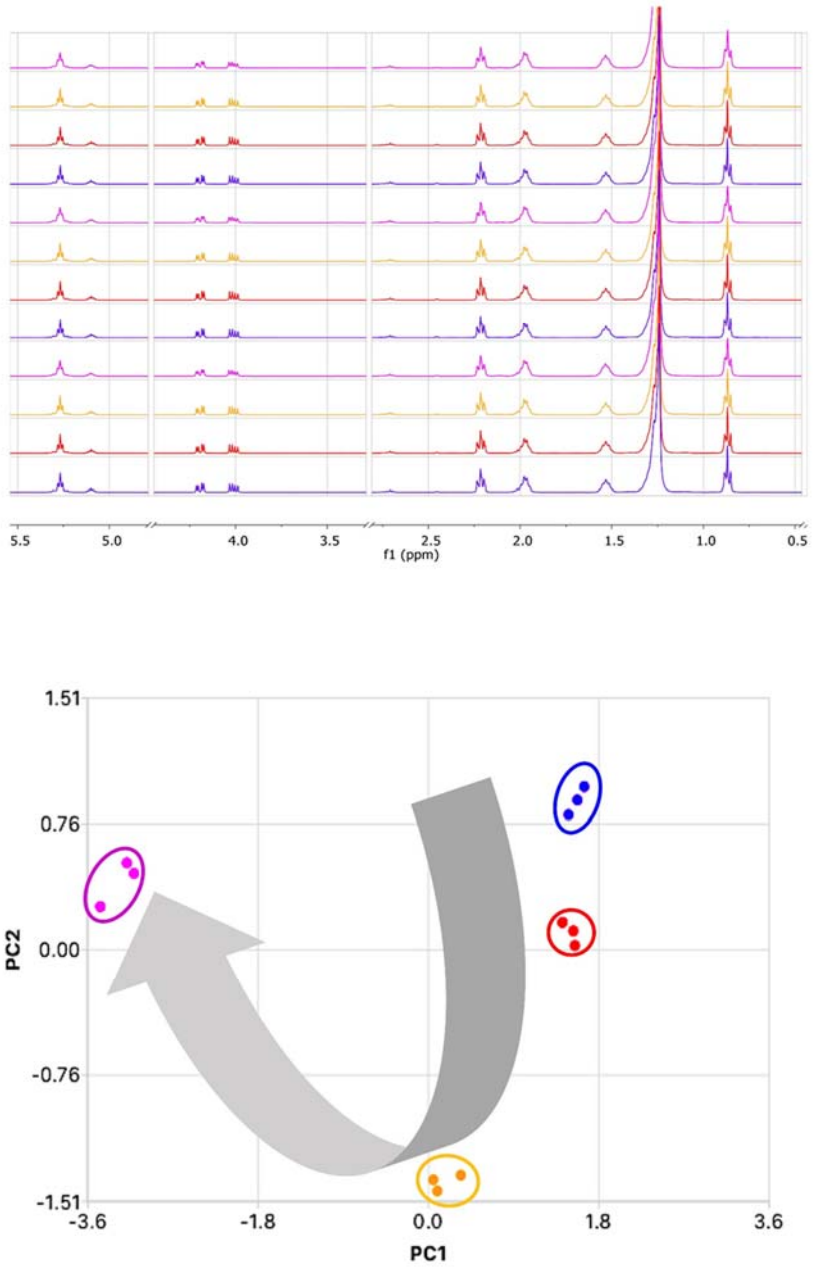


Figura 6.6: Espectros apilados de los lotes control, bajo en sal y con extracto a lo largo de los días 1, 7, 21 y 49 y score plot *tras PCA.*

En la gráfica del PCA puede apreciarse cómo aparecen las muestras perfectamente agrupadas en función del tiempo de evolución. A medida que avanzan los días, la posición de las muestras avanza a lo largo de una trayectoria como la representada con la flecha gris.

En conclusión, el PCA aplicado sobre los espectros de muestras de extracto lipídico de embutido es una herramienta muy potente para diferenciar y discriminar tipos de embutido en función de su materia prima cárnica de partida. Para embutidos cuya materia prima cárnica es semejante, el PCA también es capaz de diferenciar las muestras en función de su tiempo de evolución.

Esta primera aproximación de la aplicación del potencial quimiométrico del PCA sobre muestras reales ha sido muy exitosa y sienta las bases de futuros trabajos centrados en autenticación de alimentos de calidad. Además se explorará la extensión de la técnica a otras matrices alimentarias como nueces, alubias o queso.

6.5 BIBLIOGRAFÍA

(1) Molly, K.; Demeyer, D.; Johansson, G.; Raemaekers, M.; Ghistelinck, M.; Geenen, I. The Importance of Meat Enzymes in Ripening and Flavour Generation in Dry Fermented Sausages. First Results of a European Project. *Food Chem.* **1997**, *59* (4), 539–545.

(2) Gambacorta, G.; Sinigaglia, M.; Schena, A.; Baiano, A.; Lamacchia, C.; Pati, S.; La Notte, E. Changes in Free Fatty Acid and Diacylglycerol Compounds in Short-Ripening Dry-Cured Sausage. *J. Food Lipids* **2009**, *16* (1), 1–18.

(3) Balzan, S.; Taticchi, A.; Cardazzo, B.; Urbani, S.; Servili, M.; Di Lecce, G.; Zabalza, I. B.; Rodriguez-Estrada, M. T.; Novelli, E.; Fasolato, L. Effect of Phenols Extracted from a By-Product of the Oil Mill on the Shelf-Life of Raw and Cooked Fresh Pork Sausages in the Absence of Chemical Additives. *LWT - Food Sci. Technol.* **2017**, *85*, 89–95.

(4) Narváez-Rivas, M.; Vicario, I. M.; Constante, E. G.; León-Camacho, M. Changes in the Concentrations of Free Fatty Acid, Monoacylglycerol, and Diacylglycerol in the Subcutaneous Fat of Iberian Ham during the Dry-Curing Process. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55* (26), 10953–10961.

(5) Gómez, M.; Lorenzo, J. M. Effect of Fat Level on Physicochemical, Volatile Compounds and Sensory Characteristics of Dry-Ripened “Chorizo” from Celta Pig Breed. *Meat Sci.* **2013**, *95* (3), 658–666.

(6) Pérez-Camino, M. C.; Moreda, W.; Cert, A. Effects of Olive Fruit Quality and Oil Storage Practices on the Diacylglycerol Content of Virgin Olive Oils. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49* (2), 699–704.

(7) Fronimaki, P.; Spyros, A.; Christophoridou, S.; Dais, P. Determination of the Diglyceride Content in Greek Virgin Olive Oils and Some Commercial Olive Oils by Employing 31P NMR Spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50* (8), 2207–2213.

(8) Caponio, F.; Paradiso, V. M.; Bilancia, M. T.; Summo, C.; Pasqualone, A.; Gomes, T. Diacylglycerol Isomers in Extra Virgin Olive Oil: Effect of Different Storage Conditions. *Food Chem.* **2013**, *140* (4), 772–776.

(9) Aguirrezábal, M. M.; Mateo, J.; Domínguez, M. C.; Zumalacárregui, J. M.

The Effect of Paprika, Garlic and Salt on Rancidity in Dry Sausages. *Meat Sci.* **2000**, *54* (1), 77–81.

(10) Shah, M. A.; Bosco, S. J. D.; Mir, S. A. Plant Extracts as Natural Antioxidants in Meat and Meat Products. *Meat Sci.* **2014**, *98* (1), 21–33.

(11) Wood, J. D.; Enser, M.; Fisher, A. V.; Nute, G. R.; Sheard, P. R.; Richardson, R. I.; Hughes, S. I.; Whittington, F. M. Fat Deposition, Fatty Acid Composition and Meat Quality: A Review. *Meat Sci.* **2008**, *78* (4), 343–358.

(12) Straadt, I. K.; Aaslyng, M. D.; Bertram, H. C. Assessment of Meat Quality by NMR-an Investigation of Pork Products Originating from Different Breeds. *Magn. Reson. Chem.* **2011**, *49* (SUPPL. 1).

(13) Emwas, A. H.; Saccenti, E.; Gao, X.; McKay, R. T.; dos Santos, V. A. P. M.; Roy, R.; Wishart, D. S. Recommended Strategies for Spectral Processing and Post-Processing of 1D 1 H-NMR Data of Biofluids with a Particular Focus on Urine. *Metabolomics* **2018**, *14* (3), 31.

CAPÍTULO 7
CONCLUSIONES

"Cuando llegues al final de lo que debes saber,
estarás al principio de lo que debes sentir"

Gibran Khalil Gibran

El presente trabajo ha profundizado en la aplicación de la técnica de espectroscopia de RMN en el análisis de grasa, utilizando equipos de campo medio (400 MHz). Ha sido necesaria una optimización de la metodología con el fin de evitar problemas de solapamiento. La nueva metodología de análisis aporta rapidez, sencillez y versatilidad y ha sido aplicada con éxito al análisis de la fracción lipídica de los embutidos en casos reales de elaboración industrial.

A continuación, se describen las conclusiones más relevantes.

- Ha sido puesto a punto un procedimiento de preparación de muestras de extracto lipídico basado en la extracción con cloroformo. El procedimiento es sencillo, relativamente rápido y no requiere de equipamiento sofisticado, por lo que puede ser fácilmente implementado en cualquier laboratorio.
- Ha sido ajustada la concentración de muestra para el análisis de RMN, buscando un equilibrio entre sensibilidad frente a señales mayoritarias y buena línea base.
- Han sido optimizados los parámetros experimentales de análisis con vistas a encontrar un equilibrio entre tiempo y calidad de espectro. Se ha encontrado que una demora de relajación d1 = 10 s y un número de 64 *scans* permiten resultados cuantitativos y buena sensibilidad con tiempos de experimento de 15 min. La introducción de secuencias de pulsos de desacoplamiento de ^{13}C elimina las señales satélite y simplifica el espectro, evitando solapamientos indeseados.
- Algunos problemas causados por solapamientos han podido ser solventados aplicando estrategias como la irradiación selectiva, la utilización del reactivo de desplazamiento AgFOD o la derivatización de la

muestra con reactivos como el 2-cloro-4,4,5,5-tetrametildioxafosfolano o el cloruro de 4-fluorobenzoilo.

- Ha sido estudiado el efecto del cambio de disolvente en el desplazamiento químico de las señales. Varios disolventes deuterados (benceno-d6, acetona-d6, acetonitrilo-d3 y dimetilsulfóxido-d6) así como sus mezclas con CCl_4 y CS_2 han sido probados.
- De todas las variantes estudiadas, las mezclas de DMSO-d6 con CCl_4 y CS_2 han demostrado claras ventajas pues resuelven el problema de solapamiento de las señales de 1,3-DAG y permiten la cuantificación de los ácidos grasos libres.
- La nueva metodología de análisis, incorporando como disolvente la mezcla $CS_2/(CD_3)_2SO/CHCl_3$ en proporciones 8:2:1, permite la obtención de la siguiente información composicional a partir de un único experimento:
    - Porcentaje de grasa saturada e insaturada
    - En grasas de origen vegetal o de animales monogástricos, el porcentaje de monoinsaturados, diinsaturados (linoleico)y triinsaturados (linolénico)
    - En grasas de origen animal, el porcentaje de grasas omega-3 y el porcentaje de DHA y de EPA+ARA
    - Porcentaje de 1,3-DAG, 1,2-DAG, 1-MAG y 2-MAG
    - Porcentaje de ácidos grasos libres
- La metodología optimizada de análisis ha sido comparada frente a técnicas clásicas de análisis como índice de yodo y acidez libre, obteniendo muy buenas correlaciones.
- Ha sido llevada a cabo, con éxito, la monitorización y seguimiento de la degradación térmica de aceites.
- Ha sido estudiada la evolución de la lipólisis en chorizo en ejemplos reales de producción de embutido. Se han realizado análisis a lo largo de todo el proceso de elaboración, maduración-secado y conservación. Se han obtenido datos de porcentaje de 1,2-DAG, 1,3-DAG, 1-MAG y ácidos grasos libres a diferentes días del ciclo para compararlos entre sí.
- Ha podido constatarse que, en las primeras etapas, los 1,2-DAG son lo que crecen más rápidamente, aunque posteriormente permanecen constantes. El crecimiento de los 1,3-MAG y de los AGL es progresivo.

- Ha sido comprobada la utilidad de la nueva metodología en el estudio de los efectos de cambios o innovaciones en el proceso de elaboración de chorizo en casos reales de producción.
    - Ha sido estudiado el efecto de la modificación de ingredientes en la evolución de la lipólisis. Chorizos con un 30% menos de sal y chorizos que incorporan un antioxidante de té fueron comparados frente a un lote control.
    - También han sido comparados chorizos elaborados a partir de diferentes materias primas cárnicas.
    - Asimismo, se han tratado los datos espectrales mediante análisis quimiométricos no supervisados como el PCA y ha podido constatarse su capacidad de diferenciar muestras de embutido, tanto en función de la materia prima cárnica como en función del tiempo de maduración.