Desarrollo de Métodos para la Determinación de Perfiles Lipídicos en Leche por Espectroscopía RMN: Evaluación de Perfiles Anuales para Proveedores de Empresas Regionales

Foto: pexels.com

Gabriela Larroque
Departamento de Química del Litoral, CENUR Litoral Norte, UdelaR

Paula Fernández
Departamento de Química del Litoral, CENUR Litoral Norte, UdelaR

Lucia Grille
Departamento de CyT de la Leche, Facultad de Veterinaria, UdelaR

Andrés López
Departamento de Química del Litoral, CENUR Litoral Norte, UdelaR

Guillermo Moyna
Departamento de Química del Litoral, CENUR Litoral Norte, UdelaR

1. INTRODUCCIÓN

La leche es la principal fuente de nutrientes en mamíferos durante la infancia y es muy importante en adultos. Está compuesta por lípidos, proteínas, y carbohidratos, y contiene además una gran variedad de compuestos bioactivos, como ser inmunoglobinas, nucleótidos, y oligosacáridos. Los lípidos de la leche se encuentran en forma de glóbulos grasos. Aproximadamente el 98% de la grasa contenida en estos consiste de triglicéridos, siendo el 2% restante compuesto por diacilglicéridos, fosfolípidos, ceras, y colesterol. La grasa de leche contiene además trazas de hidrocarburos, compuestos volátiles, y vitaminas liposolubles.

La composición de los ácidos grasos en leche deriva principalmente de la alimentación y la actividad microbiológica en el rúmen del animal (Mansson, 2008; Schroeder, 2003). En Uruguay, la cría y engorde de ganado vacuno se realiza en condiciones pastoriles, con el campo natural como principal soporte forrajero. Aún en el caso de los sistemas agrícola-ganaderos más intensivos, como los del litoral oeste del país, el pasto constituye la dieta base de los animales y solamente en algunos casos se suministra suplemento a los mismos, fundamentalmente en la etapa de terminación. Sin embargo, la inclusión de alimentos concentrados en la formulación de las dietas de los animales en engorde en pastoreo ha demostrado ser una alternativa que mejora los resultados de los sistemas de invernada.

El presente trabajo resume parte de un proyecto interdisciplinario entre el Departamento de Química del Litoral (DQL) y Consorcio Regional de Innovación (CRI) Lechero del Litoral, en el cual se determinaron los perfiles lipidícos anuales en leche producida por establecimientos de la región utilizando resonancia magnética nuclear (RMN), y el estudio de los resultados por métodos de análisis multivariado de componentes principales (ACP). La aplicación de estas técnicas al estudio de variaciones en la composición de la leche esta ampliamente descrita en la literatura (Andreotti, 2006; Sacco, 2009; Renou, 2004). Como se detalla a continuación, nuestros resultados permiten establecer correlaciones entre los perfiles lipídicos y las variaciones estacionales, el tipo de alimentación, y las condiciones del establecimiento, y ratifican la utilidad de esta metodología.

2. METODOLOGIA DE MUESTREO

Se realizó un muestreo en los departamentos de Río Negro y Paysandú. Se tomaron 180 muestras de leche provenientes de tanque de frío luego de dos ordeñes para cada uno de los 15 productores remitentes a una de las industrias lácteas de la

región. Los establecimientos fueron seleccionados mediante un muestreo aleatorio estratificado basado en variables de tamaño, nivel tecnológico, e intensificación del sistema productivo. Este muestreo consistió en la división previa de la población de estudio en grupos homogéneos (estratos) respecto a la característica a estudiar (producción de leche).

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Extraccion de Lípidos

Una muestra de leche (1 g) se combina con una mezcla de cloroformo y metanol (2:1, 10 mL), y la solución heterogénea resultante se agita durante tres minutos. A esta se le agrega buffer acetato (pH 3, 2 mL), se agita tres minutos adicionales, y se centrifuga a 3500 rpm por 20 minutos. La fracción lipídica se concentra a presión reducida y 40 ºC, se retoma en cloroformo (10 mL), se homogeniza por ultrasonido, y se seca con sulfato de sodio (2 g). Esta mezcla es centrifugada nuevamente a 3500 rpm durante 5 minutos, se filtra el sobrenadante, y el solvente orgánico se evapora a presión reducida (Figura 1). El peso fue registrado antes y después de forma de obtener el porcentaje de grasa de cada muestra.

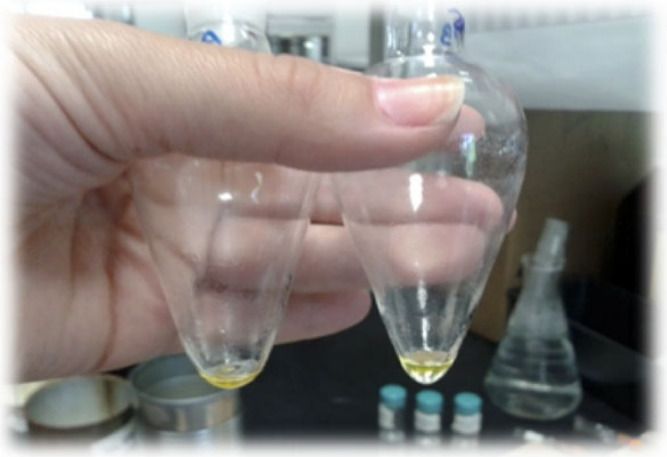

Figura 1. Extractos de grasa de leche.

3.2. Espectroscopía RMN

Los espectros ^{1}H RMN de las muestras de grasa se registraron en un espectrómetro Bruker AVANCE III 400 operando a una frecuencia de ^{1}H de 400,13 MHz (Figura 2). Se empleó un tiempo de adquisición de 4,09 s, un reciclado entre barridos de 10,00 s, y se acumularon un total de 64 barridos. Todos los espectros se obtuvieron en $CDCl_3$ a 25 °C, utilizando un 0,03% de tetrametilsilano (TMS) como referencia interna.

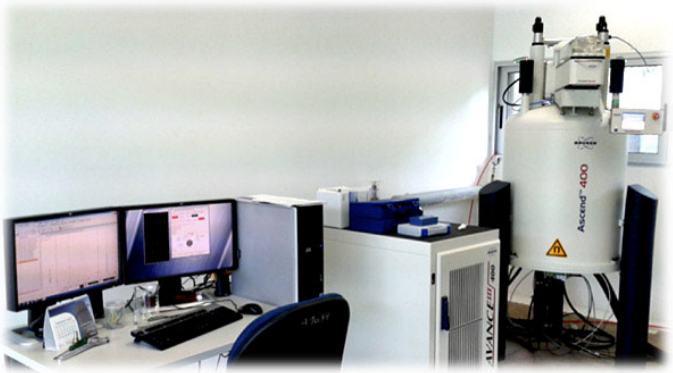

Figura 2. Equipo de RMN Bruker AVANCE III 400 utilizado en los estudios.

3.3. Análisis Estadístico

Se realizaron análisis de componentes principales (ACP) empleando el paquete InfoStat (Universidad Nacional de Córdoba, 2011). Se emplearon como variables los porcentajes promedio de ácidos grasos saturados (%SFA), monoinsaturados (%MUFA), linolénico (%Linolénico), y linoléico (%Linoléico) en todos los análisis.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Generalmente, la determinación de la composición lipídica en leche se lleva a cabo utilizando técnicas cromatográficas (Seppänen-Laakso, 2002), incluyendo cromatografía en capa fina (TLC), gaseosa (GC), y líquida (HLPC). Sin embargo, la espectroscopía de RMN es una alternativa analítica rápida y robusta para el análisis de los perfiles lipídicos (Fangyuhu, 2004). En un espectro de RMN de hidrógeno (^{1}H RMN), cada señal corresponde con un tipo de hidrógeno en la molécula. La región donde la señal aparece en el espectro, o corrimiento químico (d), y sus características, o patrón de acoplamiento (*J*), están afectadas por su entorno químico, es decir los grupos funcionales y átomos que están enlazados o próximos al o los hidrógenos correspondientes. Por lo tanto, es posible diferenciar e identificar señales en un espectro que se corresponden con los diferentes tipos de hidrógenos en una molécula (Claridge, 1999). De esa forma, al analizar un triglicérido por medio de ^{1}H RMN es posible identificar los diferentes tipos de hidrógenos y sus señales correspondientes (Figura 3).

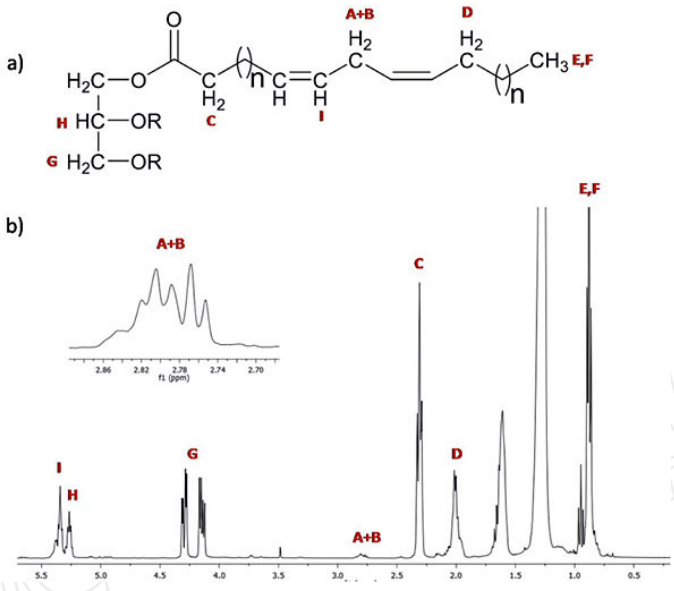

Figura 3. a) Estructura genérica de un triglicérido. b) Perfil ^{1}H RMN de una matriz lipídica en $CDCl_3$. Se indican las señales correspondientes a los distintos hidrógenos de la molécula.

Las muestras de grasas de leche son una mezcla formada mayormente por ácidos grasos libres, mono, di, y triglicéridos. Con esta información y conociendo los espectros de ^{1}H RMN de varios ácidos grasos se pueden identificar señales características de los lípidos (hidrógenos alílicos, bisalílicos, y olefínicos, entre otros), y describir y caracterizar la matriz en estudio (Johnson, 1962).

4.1. Caracterización de la matriz lipídica

Se caracterizó la matriz lipídica tomando en cuenta las integrales de las señales A-F (Figura 3). En todos los casos las integrales fueron realizadas en forma relativa a la señal de los

hidrógenos ? y ?' del glicerol (4.25 ppm, señal G), normalizando esta integración a 4.00 unidades. Los hidrógenos en dobles enlaces, u olefínicos, se integraron junto con el hidrógeno ? del glicerol (5.45 ppm, señal H + I).

El total de moléculas de ácidos grasos puede expresarse de dos maneras. Una es mediante la señal del metilo terminal (E + F) divido por el número de hidrógenos que originan esa señal (3 unidades), y otra es en base a la señal de los hidrógenos vecinos al grupo carbonilo (C) divido el número de hidrógenos que originan esta señal (2 unidades). Ambas son señales presentes en cualquier ácido graso. Por lo tanto se correlacionan con el total de moléculas de ácidos grasos, y esto se puede expresar de la siguiente forma:

$$\frac{E+F}{3}=\frac{C}{2}$$

Las señales correspondientes a los hidrógenos bisalílicos de los ácidos grasos linolénico y linoléico (18:3 y 18:2, respectivamente) corresponden a la señal A + B. Mediante un proceso de deconvolución de esta señal compleja se pudo obtener por separado los porcentajes de cada uno de los ácidos grasos. La suma de ambos corresponde al total de ácidos grasos poliinsaturados (%PUFA). El porcentaje de ácidos grasos monoinsaturados (%MUFA) se obtuvo a partir de los insaturados totales (%UFA) y %PUFA de la siguiente manera (Brescia, 2004; Sacchi, 1996):

$$\%MUFA=\%UFA-\%PUFA$$

El contenido de ácidos grasos insaturados totales (%UFA) se determina teniendo en cuenta la señal de los hidrógenos olefínicos (I) según:

$$\%UFA=\frac{I}{C}$$

De manera similar se calcula el %PUFA, teniendo en cuenta la señal de los hidrógenos bisalílicos (A + B):

$$\%PUFA=\frac{A+B}{C}$$

El cálculo del porcentaje de ácidos linolénico (%Linolénico) y linoléico (%Linoléico) se realizó en base a la señal A + B mediante las siguientes ecuaciones:

$$\%Linolénico=\frac{X(A+B)}{C}\quad \%Linoleico=\frac{Y(A+B)}{C}$$

Siendo X e Y las fracciones de ácidos linolénico y linoléico, respectivamente, obtenidas por deconvolución de la señal (Sacchi, 1996).

4.2. Análisis Multivariado de Componentes Principales (ACP)

A partir de los resultados obtenidos se analizó la variabilidad estacional y entre productores, ambas respecto a la composición lipídica. Para ello se realizaron análisis estadísticos multivariados de componentes principales, o ACP (Figuras 4 y 5), tomando como variables en ambos casos %UFA, %MUFA, %SFA, %Linolénico y %Linoléico.

Según el ACP de la Figura 4, que relaciona composición lipídica con productores, la componente principal 1 separa los ácidos grasos saturados (%SFA) de los insaturados (%UFA), por lo tanto la mayor variabilidad (60,3%) se puede explicar mediante estas dos variables. El grupo A, que incluye a 6 productores, está asociado al contenido de ácido linoléico. Dentro de este grupo, dos productores también se asocian a un mayor %MUFA (productores 1 y 12 en el gráfico).

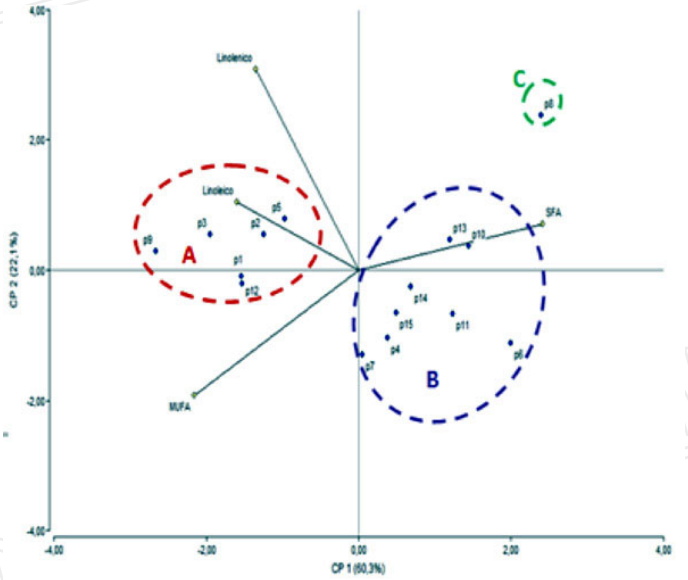

Figura 4. Distribución de los productores en los dos ejes del ACP. Las letras A, B, C representan los distintos grupos de productores encontrados. El primer componente principal explica el 60,3% de la varianza total de las observaciones. La segunda componente principal explica el 22,1%.

El grupo B, con 8 productores, está asociado al contenido de ácidos grasos saturados. Sin embargo el productor 8 no se asocia claramente con ninguno de los grupos identificados.

Si se cotejan los datos recabados para los diferentes productores, como ser número de animales, tamaño del tambo, y horas de acceso a la pastura, podemos observar que los pertenecientes al grupo A ofrecen a su ganado más horas de acceso a la pastura en el día, así como más disponibilidad de área por numero de vacas en ordeñe. Por lo tanto, el ganado en estos establecimientos tiene una dieta más rica en pasturas, las cuales son una fuente importante de ácidos grasos insaturados 18:3 y 18:2 (Nuernberg, 2005).

En la Figura 5 se muestra la correlación entre la composición lipídica y los meses del año, o variabilidad estacional. Se

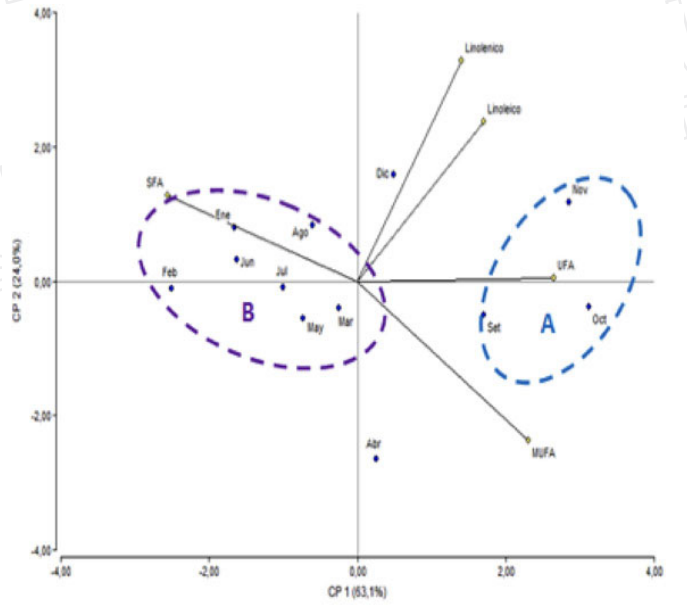

Figura 5. Distribución estacional en los principales dos ejes del ACP. Las letras A y B representan las agrupaciones de los meses encontrados. La primer componente principal explica el 63,1% de la varianza total en las observaciones. La segunda componente principal explica el 24,0%.

observa una asociación de los meses de setiembre, octubre, noviembre con el porcentaje de ácidos grasos insaturados. Esto es consistente con el aumento en primavera de la disponibilidad y calidad de las pasturas, que como se mencionó anteriormente son una fuente importante de este tipo de ácidos (Nuernberg, 2005).

Similarmente, los periodos de mayo a agosto y enero a marzo están agrupados y asociados con un mayor contenido de ácidos grasos saturados. Esto es consistente con la disminución en la disponibilidad y calidad de pasturas que se observa en invierno y verano. El mes de diciembre no se encuentra dentro de ninguno de los dos grupos, pero se asocia claramente con un mayor contenido de ácidos grasos poliinsaturados (18:2 y 18:3). Por otro lado, no se encontró ninguna correlación observable para el mes de abril con las variables analizadas.

5. CONCLUSIONES

A pesar de ser esperables, los resultados obtenidos en este estudio demuestran el potencial de la espectroscopia RMN combinada con métodos estadísticos. Las metodología empleada permitió estudiar correlaciones entre variables de entorno y los cambios en la composición lipídica de un gran numero de muestras de leche de manera rápida y robusta. Por mas que existen otros métodos para llevar a cabo este tipo de análisis, estos requieren de procesos de preparación de muestra elaborados y mayor tiempo de análisis.

Es importante señalar también que los métodos y herramientas presentados en este trabajo pueden ser fácilmente extrapolados al análisis de otras matrices agropecuarias cuya composición depende de variables intrínsecas y de entorno. Por ejemplo, es posible establecer correlaciones entre los perfiles metabólicos de distintos cultivos con su resistencia a plagas, investigar el efecto que distintos pesticidas o fármacos veterinarios tienen sobre el metabolismo de una plaga, o certificar el origen de un producto en función de su quimiotipo. Un numero de proyectos en estos temas se vienen desarrollando en el laboratorio, y nuestros resultados serán reportados oportunamente.

BIBLIOGRAFÍA

ANDREOTTI, G.; TRIVELLONE, E.; MOTTA A. 2006. Characterization of buffalo milk by ^{31}P nuclear magnetic resonance spectroscopy. J. Food Compos. Anal., 19: 843-849.

BRESCIA, M. A.; MAZZILLI, V.; SGARAMELLA, A.; GHELLI, S.; FANIZZI F.P.; SACCO, A. 2004. ^{1}H NMR characterization of milk lipids: A comparison between cow and buffalo milk. J. Am. Oil Chem. Soc., 81: 431-436.

CLARIDGE, T. 1999. *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry*. Pergamon Press, Amsterdam.

FANGYUHU, K.; ITO-ISHIDA, M.; KAMINOGAWA, S.; TANOKURA, M. 2004. Nondestructive observation of bovine milk by NMR spectroscopy: Analysis of existing states of compounds and detection of new compounds. J. Agric. Food Chem., 52: 4969-4974.

JOHNSON, L.; SHOOLERY, J. 1962. Determination of unsaturation and average molecular weight of natural fats by nuclear magnetic resonance. Anal. Chem., 34: 1136-1139.

MANSON, H. 2008. Fatty acids in bovine milk fat. Food Nutr. Res., 52: doi: 10.3402/fnr.v52i0.1821.

NUERNBERG, K.; DANNENBERGER, D.; NUERNBERG, G.; ENDER, K.; VOIGT, J.; SCOLLAN, N.D.; WOOD, J.D.; NUTE, G.R.; RICHARDSON, I.R. 2005. Effect of a grass-based and a concentrate feeding system on meat quality characteristics and fatty acid composition of longissimus muscle in different cattle breeds. Livest. Prod. Sci., 94: 137-147.

RENOU, J.P.; DEPONGE, C.; GACHON, P.; BONNEFOY, J.C.; COULON, J.B.; GAREL, J.P.; VERITE, R.; RITZ, P. 2003. Characterization of animal products according to geographic origin and feeding diet using nuclear magnetic resonance and isotope ratio mass spectrometry: cow milk. Food Chem., 85: 63-66.

SACCHI, R.; PATUMI, M.; FONTANAZZA, G.; BARONE, P.; FIORDIPONTI, P.; MANNINA, L.; ROSSI, E.; SEGRE, A.L. 1996. A high-field ^{1}H nuclear magnetic resonance study of the minor components in virgin olive oils. J. Am. Oil Chem. Soc., 73: 747-758.

SACCO, D.; BRESCIA, M.A.; SGARAMELLA, A.; CASIELLO, G.; BUCCOLIERI, A.; OGRINC, N.; SACCO, A. 2009. Discrimination between southern Italy and foreign milk samples using spectroscopic and analytical data. Food Chem., 114: 1559-1563.

SCHROEDER, G. F.; DELAHOY, J. E.; VIDAURRETA, I.; BARGO, F. GAGLIOSTRO, G. A.; MULLER, L. D. 2003. Milk fatty acid composition of cows fed a total mixed ration or pasture plus concentrates replacing corn with fat. J. Dairy Sci., 86: 3237-3248.

SEPPANEN-LAAKSO, T.; LAAKSO, I.; HILTUNEN, R. 2002. Analysis of fatty acids by gas chromatography, and its relevance to research on health and nutrition. Anal. Chem. Acta, 465: 39-62.

Foto: David Puig Pérez