



UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Química Analítica, Nutrición y
Bromatología
Área de Nutrición y Bromatología



**ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN DEL ERIZO
DE MAR PARACENTROTUS LIVIDUS LMK.
MODIFICACIONES DURANTE EL PROCESO
DE ENLATADO**

ANA RODRÍGUEZ BERNALDO DE QUIRÓS

Santiago de Compostela, Diciembre 2001

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología

Área de Nutrición y Bromatología



**ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN DEL ERIZO DE
MAR *PARACENTROTUS LIVIDUS* LMK.
MODIFICACIONES DURANTE EL PROCESO DE
ENLATADO**

ANA RODRÍGUEZ BERNALDO DE QUIRÓS

Santiago de Compostela, Diciembre 2001

PILAR BERMEJO BARRERA, DIRECTORA DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA, NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

INFORMA: Que Dña Ana Rodríguez Bernaldo de Quirós presenta el trabajo titulado “ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN DEL ERIZO DE MAR *PARACENTROTUS LIVIDUS* LMK. MODIFICACIONES DURANTE EL PROCESO DE ENLATADO” realizado bajo la dirección de la Dra. Julia López Hernández y del Dr. Jesús Simal Lozano, en los laboratorios de Bromatología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Santiago de Compostela.

Fdo. Dra. Dña: Pilar Bermejo Barrera

Santiago de Compostela, Diciembre de 2001

JULIA LÓPEZ HERNÁNDEZ, PROFESORA TITULAR DEL ÁREA DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA Y JESÚS SIMAL LOZANO, CATEDRÁTICO DE BROMATOLOGÍA, TOXICOLOGÍA Y ANÁLISIS QUÍMICO APLICADO

AUTORIZAN a Dña Ana Rodríguez Bernaldo de Quirós a presentar la Tesis titulada “ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN DEL ERIZO DE MAR *PARACENTROTUS LIVIDUS* LMK. MODIFICACIONES DURANTE EL PROCESO DE ENLATADO” para optar al Grado de Doctor, la cual ha sido realizada bajo nuestra dirección en los en los laboratorios de Bromatología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Santiago de Compostela

Y para que así conste, se expide la presente en Santiago de Compostela en Diciembre de 2001.

Fdo. Dña Julia López Hernández

Fdo. D. Jesús Simal Lozano.

Fdo. Dña. Ana Rodríguez Bernaldo de Quirós

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento:

A los Directores de este trabajo, la Dra Julia López Hernández y el Dr. Jesús Simal Lozano por los conocimientos científicos y técnicos que de ellos he recibido.

A la Dra. M^a José González Castro, al Dr. Carlos De la Cruz García y a Marta Piñeiro Sotelo por la ayuda prestada en la realización de este trabajo.

A Sarah Pastorelli, Raquel Sendón García y Cristina Grela Docal por sus consejos prácticos y por su ayuda desinteresada.

Al Ministerio de Educación y Cultura por la concesión de la beca de Formación del Profesorado Universitario (FPU) del Programa Sectorial de Formación del Profesorado Universitario y Personal Investigador.

A la Xunta de Galicia por la concesión del proyecto XUGA 20301B98.

A D. Manuel Loureiro, director de Conservas y Ahumados LOU, por proporcionarnos las muestras.

A todos los Profesores y Compañeros de este Departamento por la ayuda proporcionada.

A mi padre



ÍNDICE

1. – INTRODUCCIÓN	1
1.1. - Erizo de mar, <i>Paracentrotus lividus</i>	2
1.2. – Muestras	7
1.3. - Objetivo del trabajo	8
1.4. – Referencias bibliográficas	11
2. - COMPUESTOS AROMÁTICOS	12
2.1. – Introducción	13
2.2. – Parte experimental	18
2.3. – Resultados y discusión	24
2.4. - Referencias bibliográficas	34
3. – VITAMINAS HIDROSOLUBLES	41
3.1. – Introducción	42
3.2. – Parte experimental	48
3.3. – Resultados y discusión	55
3.4. - Referencias bibliográficas	66
4. – CAROTENOIDES Y VITAMINAS LIPOSOLUBLES	73
4.1. – Introducción	74
4.2. – Parte experimental	79
4.3. – Resultados y discusión	84
4.4. - Referencias bibliográficas	92
5. – LÍPIDOS	96
5.1. – Introducción	97

5.2. – Parte experimental	103
5.3. – Resultados y discusión	108
5.4. - Referencias bibliográficas	115
6. – PROTEÍNAS Y AMINOÁCIDOS PROTEINOGÉNICOS	121
6.1. – Introducción	122
6.2. – Parte experimental	128
6.3. – Resultados y discusión	133
6.4. - Referencias bibliográficas	139
7. – BASES PÚRICAS	143
7.1. – Introducción	144
7.2. – Parte experimental	149
7.3. – Resultados y discusión	153
7.4. - Referencias bibliográficas	161
8. – COMPOSICIÓN NUTRICIONAL	164
9. – CONCLUSIONES	168
10. – APÉNDICE	173

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxiribonucleico.

AMP: Adenosina 5'-monofosfato.

ARN:Ácido ribonucleico.

Art: Artículo

ATP: Trifosfato de adenosina.

Cap: Capítulo.

CAS: Chemical abstract service.

col: colaboradores.

2D: 2 Dimensiones.

3D: 3 Dimensiones.

Ed: Editorial.

Edn: edición.

Em: Emisión.

Exc: Excitación.

FAD: Flavin adenin dinucleótido.

FID: Flame Ionization Detector (Detector de Ionización de llama).

Fig: Figura

FMN: Flavin mononucleótido

GMP: Guanosina 5'-monofosfato.

HPLC: High Performance Liquid Chromatography (Cromatografía Líquida de Alta Resolución).

id: Internal Diameter (Diámetro interno).

IMP: Inosina 5'-monofosfato.

M: Molaridad.

mM: Milimolar.

N:Normalidad.

OPA: o-Phtaldehido.

Oxd: Oxidación.

PC: Phosphatidylcholine (Fosfatidilcolina).

PE: Phosphatidylethanolamine (Fosfatidiletanolamina).

PI: Phosphatidylinositol (Fosfatidilinositol).

PS: Phosphatidylserine (Fosfatidilserina).

Red: Reducción.

rpm: Revoluciones por minuto.

RSD: Relative Standard Deviation (Desviación Estándar Relativa).

SD: Standard Deviation (Desviación Estándar).

SM: Sphingomyelin (Esfingomielina).

UV: Ultravioleta.

Vis: Visible.

XMP: Xantosina 5'-monofosfato.

No se incluyen las abreviaturas correspondientes al Sistema Internacional de Unidades (Decreto 1257/74, de 25 de abril de 1974, publicado en el BOE nº 110 de 08/5/1974).



1. - INTRODUCCIÓN

1.1. - ERIZO DE MAR, *Paracentrotus lividus* Lmk.

1.1.1. - Morfología.

Los erizos son invertebrados marinos del grupo de los Equinodermos, emparentados con las estrellas de mar, holoturias, ofiuras y crinoideos. Se caracterizan por presentar una simetría radial y disponer de un sistema de locomoción formado por múltiples pies ambulacrales.

Se diferencian del resto de los animales del tipo entre otras cosas por su aspecto externo, tienen un caparazón de forma globosa y provisto de multitud de púas de longitud variable, que se asientan sobre un mosaico de pequeñas placas calcáreas que conforman su esqueleto. Cada púa está sujeta por medio de músculos dispuestos radialmente alrededor de su base. Mediante la contracción de estos músculos, el extremo de la espina puede describir diversas trayectorias en el espacio.

Las placas del dermatoesqueleto se diferencian en dos grupos con características distintas:

-Las placas ambulacrales, dispuestas en cinco bandas meridionales, se encuentran perforadas permitiendo la salida de los pies ambulacrales.

-Las placas interambulacrales forman las áreas situadas entre las bandas ambulacrales, no se encuentran perforadas y son de mayor tamaño.

En la parte ventral los erizos presentan la boca con una membrana que rodea una estructura característica, la linterna de Aristóteles, que consiste en una compleja disposición de las mandíbulas. La utilizan para masticar el alimento, puede ser tan fuerte que le permite perforar las rocas, para establecer su habitáculo de residencia.



Figura 1.1. – (a) Erizo de mar, *Paracentrotus lividus*. (b) Parte interna de un erizo de mar.

La parte comestible del erizo son las gónadas que en número de cinco se distribuyen bajo las placas interambulacrales desde el polo oral al aboral. Se trata de unas masas glandulares de color amarillo-anaranjado en las hembras y más blancuzco en el caso de los machos (Ramonell, 1985).

Las gónadas adquieren su máximo desarrollo durante los meses de febrero a abril, pudiendo alcanzar hasta el 30% del peso fresco del individuo (Gabin Sánchez y Lorenzo de Dios, 1993).

1.1.2. - Alimentación.

Su dieta es muy variada predominan las algas de todo tipo que crecen en el fondo aunque también puede ingerir restos de animales, pequeños moluscos (Catoira Gómez y Miguez-Rodríguez, 1988).

1.1.3. – Hábitat.

Viven casi exclusivamente en fondos rocosos, aunque también pueden encontrarse, siempre en menor cantidad, en arenales arrastrados hasta allí por efecto de las olas.

A mayor profundidad siempre sobre sustratos rocosos, aumenta su tamaño pero disminuye ligeramente la densidad de las poblaciones.

Su área geográfica abarca la totalidad del Atlántico Norte, desde el mar Báltico hasta Canarias, Azores y costas de Marruecos; hacia el este por el mar Mediterráneo occidental hasta el mar Adriático.

Esta especie excava a veces en las rocas de la costa, con frecuencia se recubre con pequeños fragmentos de algas, conchas, etc; es algo gregaria y puede hallarse en grupos, y en el Mediterráneo puede hallarse asociada con *Arbacia lixula*.

Un factor que condiciona de forma importante su distribución es la salinidad ya que se trata de animales que soportan mal las variaciones bruscas de salinidad (Catoira Gómez y Miguez-Rodríguez, 1988).

1.1.4. – Producción.

En los últimos años, se ha producido un incremento en la explotación del erizo con efectos sobre sus poblaciones que aún no han sido determinados.

Entre los principales países productores se encuentran Chile, Japón y Estados Unidos (Keesing, y Hall, 1998).

Chile, es el primer productor de la especie *Loxechinus albus*; Japón se considera el primer importador de erizo su mercado se caracteriza por la importancia de su volumen de producción, diversidad de las especies comercializadas y por no satisfacer su propia demanda y en cuanto a Estados Unidos su zona productora es la costa del Pacífico, la mayor parte de su producción es destinada al mercado japonés. Otro país importante en la comercialización del erizo de mar es Francia, es el mercado que tiene mayor relevancia a la hora de comercializar *Paracentrotus lividus* si bien su procedencia es muy diversa: gallega, asturiana, normanda, bretona e irlandesa.

El erizo de mar podría ser un nuevo recurso para la economía gallega. Actualmente es muy abundante, poco conocido y apenas introducido en el comercio gallego, sólo se consume en zonas puntuales del litoral, donde su captura se realizaba hasta hace unos años a pie para el auto consumo. En Galicia se estima que la actividad extractiva del erizo se sitúa alrededor de las 800 a 1000 Tm anuales. El principal destino que ha tenido el erizo gallego desde el comienzo de su explotación, a finales de la década de los años 70 era la exportación del producto fresco hacia el mercado asturiano primero y posteriormente hacia el francés. Dichas ventas han disminuido debido al aumento de la demanda por parte de la industria alimentaria gallega.

Es importante destacar que existe un alto porcentaje de erizo de mar en el litoral gallego que permitirá aumentar las exportaciones a países consumidores como Francia y Japón. Pero ello supone cumplir una serie de requisitos para no llegar a una situación límite en la que se agote este recurso; requisitos tales como, preservar, conservar y mantener libre de contaminación las costas, gestionar y explotar adecuadamente el recurso, y

pontenciar la investigación para conocer mejor la especie (Gabin Sánchez y Lorenzo de Dios, 1993).

1.1.5. - Conservación.

Los procesos de conservación de alimentos tienen como principales objetivos por una parte posibilitar la disponibilidad durante todo el año de productos estacionarios como es el caso del erizo de mar, cuya época de recogida son los meses desde febrero a abril y de esta forma se puede consumir durante todo el año y por otra evitar la alteración de los alimentos por diferentes causas tales como: proliferación de microorganismos, agentes físicos (aire, calor, frío, humedad, etc.), reacciones químicas (oxidación, hidrólisis) y enzimáticas etc (Cheftel y *col*; 1982).

Entre los procedimientos de conservación uno de los más empleados es la esterilización, consiste en envasarlos en un recipiente hermético y someterlos a un calentamiento para de esta forma asegurar la destrucción o inactivación de microorganismos y de enzimas susceptibles de alterarlos.

Generalmente se emplean autoclaves que trabajan a presión por encima de la atmosférica, aunque la tecnología varía según que el tratamiento se aplique antes o después del envasado del alimento (Bello Gutierrez, 2000).

1.2. - Muestras.

Las muestras de erizo de mar, *Paracentrotus lividus*, utilizadas para llevar a cabo este estudio proceden de la zona de Touriñan y se han capturado a unos 20 m de profundidad.

Las muestras enlatadas se han envasado inmediatamente después de su captura. Durante el proceso de enlatado las muestras se colocan en latas de aluminio RR90, de 90 mL de capacidad, y a continuación se adiciona cloruro sódico (750 mg) y agua se sellan a vacío y esterilizan a 112 °C durante 50 minutos.

Se han efectuado tres muestreos para poner a punto y aplicar una serie de métodos que permitan llevar a cabo la determinación de los diferentes componentes estudiados.



1.3. - Objetivo del trabajo.

A pesar de que existen numerosos trabajos sobre el erizo de mar la práctica totalidad de los mismos está centrada en estudios genéticos, bioquímicos y de desarrollo, siendo prácticamente inexistente la información disponible sobre el erizo de mar como alimento, por lo que consideramos de suma importancia efectuar un estudio analítico a fin de evaluar la calidad sensorial y nutritiva tanto en muestras frescas como en conserva.

Los objetivos del trabajo son:

1. - Puesta a punto y aplicación de métodos para la determinación de componentes nutritivos y organolépticos.
2. - Evaluación de las modificaciones que sobre dichos componentes origina el proceso de enlatado.

La metodología a seguir es la siguiente:

1. - Puesta a punto de métodos analíticos y validación de los mismos en muestras de erizo de mar, *Paracentrotus lividus*.
 - a) Extracción y/o separación, teniendo en cuenta la naturaleza de las muestras se hace un estudio de las técnicas de extracción más adecuadas para cada uno de los parámetros a analizar.
 - b) Purificación y concentración. Se realizarán en aquellos casos que sea necesario.
 - c) Análisis. Una vez extraídos los componentes se establecen los eluyentes, columnas cromatográficas y sistemas de detección más idóneos para la correcta separación y cuantificación de cada uno de los componentes. (Estudio de la precisión de la medida, del método, límites de detección y recuperación).

Los resultados del presente estudio han sido objeto de una serie de artículos publicados en revistas internacionales y comunicaciones a congresos internacionales.

Artículos:

“Protein, amino acid and fatty acid contents in raw and canned sea urchin (*Paracentrotus lividus*) harvest in Galicia (NW Spain)”. (2000) *J Sci Food Agric.* 80:1189-1192.

“Comparison of volatile components in fresh and canned sea urchin (*Paracentrotus lividus*, Lamarck) gonads by GC-MS using dynamic headspace sampling and microwave desorption”. (2001). *Eur Food Res Technol.* 212:643-647.

“Determination of carotenoids and liposoluble vitamins in sea urchin (*Paracentrotus lividus*) by high performance liquid chromatography”. (2001). *Eur Food Res Technol.* 212:687-690.

“Determination of vitamin C in sea urchin: Comparison of two HPLC methods”. (2001) *Chromatographia.* 53:246-249.

“Separation of phospholipid classes in sea urchin, *Paracentrotus lividus*, by high performance liquid chromatography” *J. Chromatogr. B* Aceptado para su publicación 18-diciembre 2001.

“Simultaneous determination of thiamin and riboflavin in sea urchin, *Paracentrotus lividus* by high performance liquid chromatography. *En prensa.*

Comunicaciones a congresos:

“Determination of vitamin C in sea urchin: Comparison of two HPLC methods”. 23nd International Symposium on Chromatography Londres, 1-5 de Octubre de 2000.

“Separation of phospholipid classes in sea urchin, *Paracentrotus lividus*, by high performance liquid chromatography”. 2nd International Symposium Separations in the Biosciences. Praga 17-20 de Septiembre de 2001.

“Determination of purines in sea urchin gonads by high performance liquid chromatography”. 2nd International Symposium Separations in the Biosciences. Praga 17-20 de Septiembre de 2001.



1.4. - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

Bello-Gutiérrez, J. (2000). “Ciencia bromatológica. Principios generales de los alimentos”. Ed. Díaz de Santos. Cap.21.

Catoira-Gómez, J.L. y Míguez-Mosquera (1988). “Ourizo de mar: un recurso en alza.” Consellería de Pesca, A Coruña, España

Cheftel, J.C; Cheftel, H. y Besançon, P. (1982). “Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos”. Ed. Acribia, pp 236-249.

Gabin-Sánchez, C.y Lorenzo de Dios, F. (1993). “ El erizo de mar un recurso con futuro”. Ed Aula del mar Fundación Caixa Galicia.

Keesing, J. K. y Hall, K.C. (1998). “Review of harvest and status of worl sea urchin fisheries points to opportunities for aquaculture”. *Journal of Shellfish Research*.17(5): 1597-1604.

Ramonell, R. (1985). “Guía dos mariscos de Galicia”. Ed Galaxia, Vigo.



2. - COMPUESTOS AROMÁTICOS

2.1. - INTRODUCCIÓN.

El aroma, junto con el sabor, está reconocido como uno de los atributos de calidad más importantes de los alimentos, ya que la especie humana, al igual que otras especies animales, han seleccionado su alimentación desde los tiempos más remotos, tanto por su aspecto visual como por la sensación agradable o desagradable producida en los órganos receptores del olor y del sabor (Alberola e Izquierdo, 1979), más que por su contenido nutricional. A pesar de ello, el aroma ha tardado mucho tiempo en ser analizado científicamente.

Otra definición de aroma es la dada por Rapp (1990) como el conjunto de elementos odorificantes y sápidos que se encuentran presentes en cantidades mínimas, pero suficientes, para comunicar a los alimentos su perfume típico y asimismo, y en parte, su sabor.

Cuando se consume un alimento, la interacción de las sensaciones sápidas, olorosas y texturales producen una sensación global que como mejor se expresa es con la palabra inglesa "flavour". El flavour es el resultado de la acción de compuestos que se dividen en dos grandes clases: los responsables del sabor y los responsables del olor, estos últimos también designados sustancias aromáticas. Sin embargo, existen compuestos que desencadenan ambas sensaciones (Belitz y Grosch, 1988).

Las principales características de las sustancias responsables del aroma de los alimentos son: la volatilidad, la elevada solubilidad en disolventes orgánicos y la relativa baja solubilidad en agua, y en ellas se apoyan la mayoría de los métodos desarrollados para analizar este tipo de sustancias (Mateos y Carbonell, 1990).

Los compuestos volátiles no representan ponderadamente más que una ínfima fracción del producto alimentario; se encuentran normalmente como trazas (Medina y *col*; 1994).

La concentración más baja de un compuesto que puede ser directamente reconocida por su olor o sabor se conoce como concentración umbral. Los datos relativos a la concentración umbral permiten comparaciones de la intensidad o potencia de las sustancias olorosas. Las concentraciones umbral dependen de la tensión de vapor de los compuestos, la temperatura y la composición del medio. Por ello son muy importantes no sólo los métodos de determinación cuantitativa sino también el dictamen de los equipos de degustación (Belitz y Grosch, 1988).

Dentro de los constituyentes del aroma, los que son realmente importantes son los responsables del olor característico del alimento, los llamados “compuestos impacto”. A veces puede aparecer un olor anormal, extraño, que habitualmente no existe en el alimento, puede producirse por pérdida de un “compuesto impacto”, o bien por un cambio de la concentración en el aroma, o por una modificación de la composición de los componentes individuales del aroma. A esta situación se le conoce como un defecto del aroma, o simplemente como un aroma anormal (Belitz y Grosch, 1988).

Según Medina y *col*; (1994), la formación de compuestos volátiles en los alimentos tiene lugar a partir de:

- a) Los procesos enzimáticos y de fermentación que intervienen en alimentos en estado natural.
- b) Reacciones de Maillard.

Los métodos de aislamiento y concentración son muy variados ya que están en función no sólo de las características físico-químicas de los compuestos volátiles (presión de vapor, solubilidad, polaridad, tamaño, etc.), sino también de la naturaleza del alimento, de su composición y de su consistencia.

Entre las técnicas empleadas para tal fin se encuentran las siguientes: destilación; extracción con solventes que puede ser extracción discontinua (Kawakami y col; 1995) o bien continua; extracción con fluidos supercríticos (Stashenco y col; 1996); extracción-destilación (Pino y col; 1998) y técnicas de espacio de cabeza.

Dentro de las técnicas de espacio de cabeza distinguimos:

a)Espacio de cabeza estático.

Consiste en la inyección directa de la fase gaseosa en equilibrio con la muestra en un espacio confinado. (Clarkson y Cooke, 1996).

b)Espacio de cabeza dinámico.

Consiste en el arrastre de los compuestos volátiles del espacio de cabeza mediante una corriente de gas inerte que conduce hacia una trampa donde quedan retenidos.

Existen dos tipos bien diferenciados de trampas donde los volátiles pueden quedar retenidos:

- Trampas criogénicas. Se pueden distinguir varios tipos de técnicas criogénicas: el crioenfoque (Shimoda y col; 1996) y el atrapado criogénico (Padrayuttawat y col; 1996).

- Trampas de materiales adsorbentes.

Los volátiles son retenidos en materiales adsorbentes que presentan poca afinidad por el agua lo que evita el problema de tener que realizar una extracción con disolvente y los problemas asociados.

Existen varios procedimientos para recuperar la muestra. El procedimiento habitual es la desorción térmica directa en la columna cromatográfica, o bien seguida de la recolección de los compuestos desorbidos en una trampa fría. Menos comúnmente se emplea la extracción con un disolvente. También a veces se lava la columna donde han quedado atrapados los compuestos. Otra técnica sería la desorción por microondas guiadas. Cualquiera de estos procedimientos tendrán influencia sobre la muestra (Van Ruth *y col*; 1994).

La técnica de desorción mediante microondas guiadas consta de cinco pasos fundamentales:

1. La purga térmica en corriente de gas inerte de los compuestos orgánicos volátiles en muestras de distintos tipos de alimentos.
2. Adsorción sobre carbón activado y/o carbón grafitizado.
3. Desorción térmica de los compuestos orgánicos volátiles atrapados mediante microondas guiadas.
4. Transferencia inmediata a la columna capilar.
5. Detección mediante detector de ionización de llama (FID) o espectrometría de masas (MS).

Algunas de las ventajas específicas de esta técnica son (Almarcha y Rovira, 1994):

1. Elevada sensibilidad (con límites de determinación del orden de 0,5 ng/ g).
2. Posibilidad de emplear cartuchos cerámicos rellenos con adsorbentes de alta capacidad y pureza como el carbón activado, siendo esta técnica, debido a las características energéticas de las microondas guiadas, la única que permite la desorción térmica eficiente de dicho adsorbente. Además pueden utilizarse distintos

adsorbentes de tipo carbonáceo con distinto tipo de grafitización y también de sílice.

3. Capacidad de analizar sustancias con estructuras muy variadas (como hidrocarburos, aldehidos, terpenos, ésteres, ácidos, aminas, compuestos organohalogenados...). Mediante la selección del adsorbente más adecuado puede lograrse una cierta sintonización entre los compuestos orgánicos volátiles más o menos ligeros y/o más o menos polares.

4. Realización de una desorción térmica prácticamente completa (con rendimientos generalmente mayores del 90%) y muy rápida (a menudo en 2-3 segundos).

5. Ausencia de componentes procedentes de reacciones secundarias y baja degradabilidad de compuestos termolábiles.

6. Transferencia casi instantánea (en unos 2 segundos) y eficiente a la columna capilar. De este modo se hace innecesario el empleo de nitrógeno líquido en etapas de criocóndensación (imprescindibles en otros sistemas eficientes con desorción térmica lenta y de baja energía) y /o criofocalización (que deben aplicarse a menudo, para reducir las deformaciones de los picos cromatográficos correspondientes a sustancias muy volátiles).

7. Otro aspecto de interés consiste en la posibilidad de conectar directamente cualquier tipo de columna capilar (con diámetros internos comprendidos entre 0,18 y 0,53 mm). De este modo pueden explotarse las prestaciones inherentes a las columnas capilares con la máxima eficacia cromatográfica (Riedel y col; 1996).

2.2. - PARTE EXPERIMENTAL.

2.2.1. - Reactivos.

- (+)-Limoneno SIGMA Art. L-2129. CAS 138-86-3.
- Benzaldehido SIGMA Art. B-6259. CAS 100-52-7.
- Decanal SIGMA Art. D-7384. CAS 112-31-2.
- Fenol SIGMA Art. P-5566. CAS 108-95-2.
- 2-Propanona SIGMA Art. A-4206. CAS 67-64-1.
- Metilbenceno SIGMA Art. 4-0084. CAS 108-88-3.

2.2.2. - Material y aparatos.

- Dispositivo de purga térmica CL/Purgue-1 (CROMLAB)
- Unidad Impingeer TOURÓN (ref. Q.1223/2)
- Baño de agua Tectrón 3473100
- Desorbedor térmico Rektorik, MW-1A
- Cromatógrafo de gases GC 8000 series (Fisons Instruments)
- Espectrómetro de Masas MD 800 (Fisons Instruments)
- Cartuchos de adsorción: cartucho R-010R (carbón grafitizado)
cartucho R-010B (carbón activo)
- Columna capilar: DB-5, 30m x 0.25 mm i.d. (J&W Scientific).
- Gas portador Helio N-50 (Sociedad Española de Oxígeno)
- Nitrógeno N-50 (Sociedad Española de Oxígeno)
- Software de adquisición de datos (MS) MASSLAB versión 1.4.
- Biblioteca de espectros Wiley.
- Ordenador Dell 486X, con 8MB de memoria RAM y con el sistema operativo MS-DOS versión 6.2.

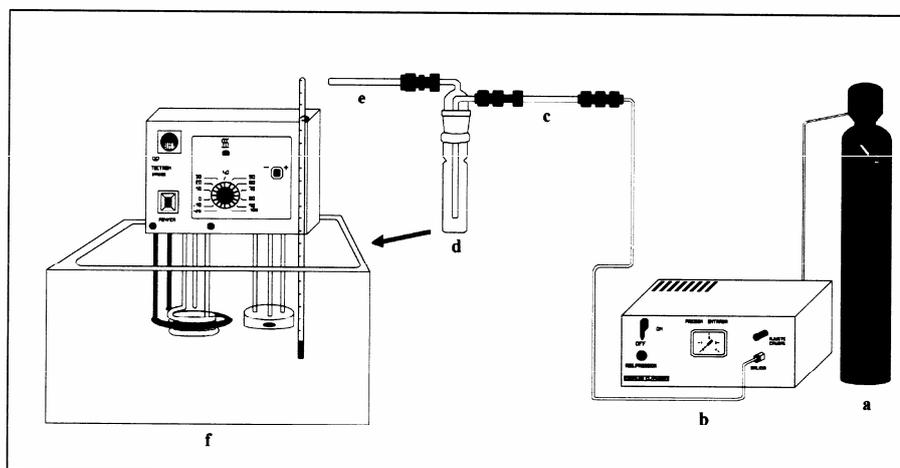
2.2.3. - Extracción de los compuestos aromáticos.

Antes de comenzar el análisis propiamente dicho, los cartuchos de adsorción se someten al mismo proceso al que más tarde será sometida la muestra con el fin de comprobar la ausencia de picos interferentes.

A continuación la muestra (5g) es colocada en el dispositivo de purga térmica (ver Fig.2.1), donde se le hace llegar una corriente de Nitrógeno que arrastrará los volátiles, los cuales quedarán atrapados en el cartucho de adsorción. La corriente de Nitrógeno antes de llegar al seno de la muestra pasa a través de un cartucho R-010B, cuya misión es retener los posibles compuestos derivados de la línea de conducción del Nitrógeno. La recolección de los volátiles se realiza en la cámara de purga, previamente calentada a 40⁰C, durante 30 minutos y con un flujo de N₂ regulado a 30 mL/min. Una vez transcurrido este tiempo se retira el cartucho y se cierran ambos extremos hasta el momento de su análisis.

En el proceso de extracción de la muestra se ensayaron distintos flujos de nitrógeno: 60, 30 y 15 mL/min y distintos tiempos de extracción (15, 30 y 60 min). Comprobándose que: con un tiempo de extracción de 15 min los últimos picos del cromatograma presentaban una baja resolución y que a los 60 min los primeros picos presentaban un área inferior con respecto a los otros tiempos de extracción probados por eso se eligió 30 min.

En cuanto al flujo de nitrógeno se comprobó que el de 15 mL/min era insuficiente y en cambio no se observaron diferencias entre el de 30 mL/min y 60 mL/min y por ello se eligió el de 30 mL/min.



a) Nitrógeno; **b)** Regulador del flujo de gas; **c)** Cartucho (R-010B); **d)** Unidad Impingeer; **e)** Cartucho (R-0101R); **f)** Baño de agua.

Figura 2.1. –Dispositivo de purga térmica.

La desorción del cartucho se realiza directamente desde el desorbedor térmico Rektorik MW-1A (ver Fig. 2.2), a la columna capilar en el cromatógrafo de gases, mediante microondas guiadas.

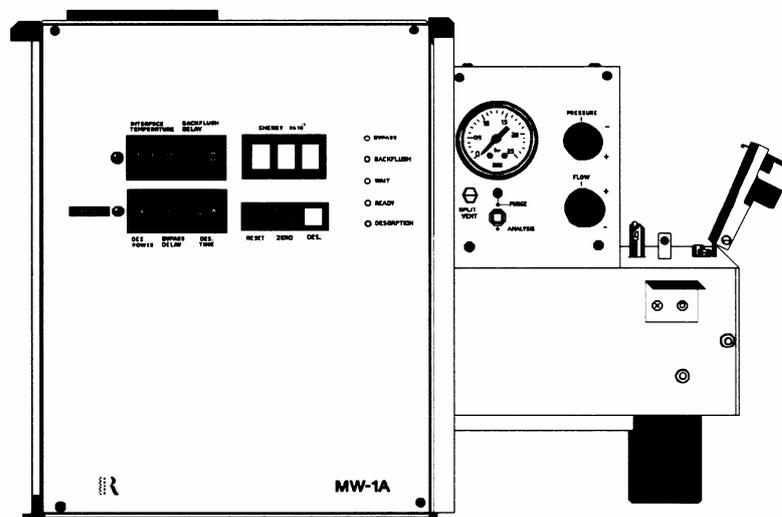


Figura 2.2. - Desorbedor térmico Rektorik MW1A.

Finalmente, el cartucho se somete a una segunda desorción con el fin de asegurar que la desorción de los volátiles ha sido completa.

2.2.4. –Condiciones de trabajo.

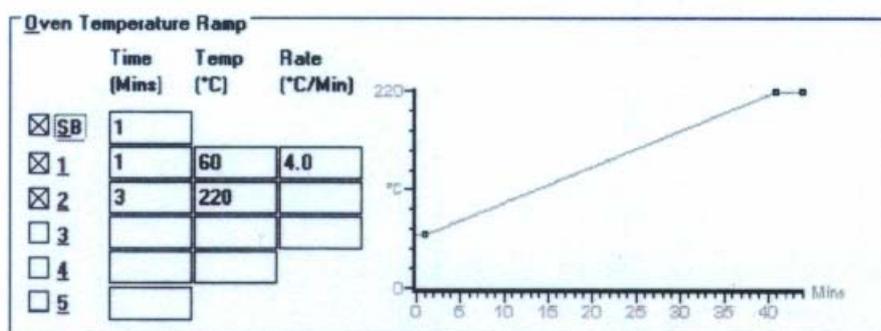
2.2.4.1. –Condiciones de la desorción térmica.

- Temperatura de la “interface”: 150 °C.
- “Backflush delay”: 20 s.
- “Desorption Power”: 7.
- “Bypass Delay”: 6 s.

- “Desorption time”: 0.8s.

2.2.4.2. -Condiciones del cromatógrafo de gases.

- Gas portador: Helio N-50.
- Presión en cabeza de columna 0.8 Bar
- Flujo del gas portador: 2.43 mL/min.
- Relación split: 1:10.
- Temperatura de la “interface”: 250 °C.
- Programa de temperatura:



2.2.4.3. –Condiciones del espectrómetro de masas:

- Temperatura de la fuente: 200 °C.
- Voltaje relativo del mutiplicador de electrones: 70 eV.
- Temperatura del detector: 230 °C.
- Análisis: en modo SCAN: * Rango de masas: 35.00-200.00 [EI+]
 * Tiempo de equilibrio: 1 min
 * Duración del análisis: 45 min.

2.2.4.4. - Identificación.

Los componentes se identificaron por comparación de sus espectros de masas con los de la biblioteca de espectros Wiley (versión 1.4). Los 39 compuestos eran identificados con un porcentaje de semejanza superior al 85%. Algunos componentes aromáticos, los predominantes en ambas muestras, (2-propanona, metilbenceno, benzaldehido, fenol, limoneno y decanal) fueron además identificados por comparación de sus tiempos de retención con los de los patrones.



2.3. –RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Las figuras 2.3 y 2.4 muestran los cromatogramas de compuestos aromáticos obtenidos para gónadas frescas y esterilizadas respectivamente.

En la tabla 2.I se recogen los compuestos identificados por comparación de sus espectros de masas con los que aparecen en la biblioteca de espectros Wiley. Los valores dados son concentraciones \pm desviaciones estándar de cuatro muestras. Los compuestos pueden incluirse en las siguientes familias químicas: alcoholes, aldehidos, hidrocarburos aromáticos, furanos, hidrocarburos, cetonas, compuestos nitrogenados, compuestos sulfurados y terpenos.

La composición de las gónadas de erizo de mar se modifica cuando ésta se somete al proceso de esterilización para el enlatado. Así se produce la aparición de nuevos compuestos, desaparición de algunos volátiles existentes y otros se hallan presentes en ambos tipos de muestras.

Con el fin de facilitar la caracterización del perfil aromático del erizo de mar se ha procedido a la agrupación de los compuestos volátiles en función de su grupo funcional característico con las medias de las cuatro muestras para cada uno de los tipos de volátiles (Figura 2.5).

Alcoholes.

Se han identificado cinco alcoholes. La presencia de alcoholes con la misma longitud de la cadena que algunos compuestos carbonilo evidencia la actividad de la oxidoreductasa presente en los tejidos (Olías y col;1993). Generalmente el umbral olfatorio de los alcoholes es relativamente alto por lo que su influencia en el aroma es insignificante (Peralta y col; 1996). No obstante los alcoholes insaturados tales como el 3-metil-4-penten-2-ol tienen un umbral olfatorio más bajo por lo que juegan un importante papel en el aroma (Seik y col;1977). El butanol y el decanol se han identificado en cangrejo de río (Vejaphan y col; 1988).

Aldehidos.

Se han encontrado dos aldehidos de cadena lineal (nonanal y decanal), uno de cadena ramificada (3-metilbutanal) y uno aromático (benzaldehido).

Nonanal, su calidad olfatoria es sebosa y el decanal presenta una calidad olfatoria a cáscara de naranja, ambos proceden principalmente de la degradación oxidativa del ácido oleico (Belitz y Grosch, 1988). Los dos aldehidos aumentan durante la esterilización debido a que los procesos de autoxidación se aceleran con las temperaturas altas. El nonanal ha sido encontrado en varios pescados (Yasuhara y Shibamoto, 1995) y en cangrejo (Chung y Cadwallader, 1993).

La principal ruta de formación de los aldehidos de cadena ramificada parece ser la desaminación-descarboxilación oxidativa vía degradación de Strecker (García y col;1991) esta reacción se verifica durante los tratamientos térmicos (Whitfield, 1992).

El aldehido 3-metilbutanal, solamente detectado en gónadas esterilizadas deriva del aminoácido leucina. Los aldehidos de cadena ramificada se consideran responsables del aroma característico de la carne enlatada (Belitz

y Grosch,1988); no obstante Vejaphan y *col*;1988 han citado que el 3-metilbutanal tiene un aroma a plantas.

El benzaldehído puede tener un efecto agradable en el aroma del erizo de mar siendo este aroma similar al aroma de almendras, nueces (Narain y *col*; 1990). Este compuesto se ha encontrado en otros mariscos tales como el cangrejo (Hayashi y *col*; 1990) y la cigala (Vejaphan y *col*; 1988). La concentración del benzaldehído se dobla durante la esterilización, probablemente porque este compuesto es generado térmicamente vía degradación de Strecker (Hayashi y *col*; 1990).

Hidrocarburos aromáticos.

Se han identificado nueve hidrocarburos aromáticos (seis alquilbencenos, un benceno clorado y dos compuestos fenólicos). Se cree que los carotenoides son los precursores de los derivados de benceno en pastas de pescado y marisco (Borenstein y Bunnell, 1966). Los alquilbencenos se han identificado en cangrejos (Tanchotikul y Hsieh, 1989) y en cangrejos de río (Matiella y Hsieh, 1990). El fenol, con un olor medicinal, contribuye negativamente al aroma de la cigala (Vejaphan y *col*; 1988) y del cangrejo (Pino y *col*; 1998).

Furanos.

Solamente se han detectado dos furanos (2-furancarboxaldehído y 2-furanmetanol) en las muestras enlatadas. Se forman a partir de la degradación de los carbohidratos o con aminoácidos a través de la reacción de Maillard. En la bibliografía se recoge que algunos furanos tienen un aroma que se asemeja al del café (Ho y *col*; 1983); no obstante su contribución al aroma del erizo de mar debe ser muy pequeño debido a los altos valores del umbral olfatorio (Shimoda y *col*; 1996).

Hidrocarburos.

Los hidrocarburos constituyen desde un punto de vista cuantitativo, el grupo más importante de compuestos volátiles en el erizo de mar (32 y 22% en gónadas frescas y enlatadas respectivamente). A pesar de las altas cantidades de estos compuestos probablemente no contribuyen de forma notable al aroma debido a sus altos valores de umbral olfatorio (Cha y col; 1993). Se han identificado seis hidrocarburos, siendo los alcanos los constituyentes mayoritarios, los compuestos predominantes son el 2,5,6-trimetildecano y el 3-metilpentano en gónadas frescas y esterilizadas respectivamente. Los hidrocarburos pueden formarse por procesos de auto-oxidación a través de los radicales alquilo o a partir de la descomposición de carotenoides (Pippen y col; 1969). Se ha sugerido que los alcanos saturados pueden proceder de la descarboxilación y rotura del enlace carbono-carbono de los ácidos grasos de cadena larga (Watanabe y Sato, 1971).

Cetonas.

Un total de seis cetonas han sido identificadas, la cetona mayoritaria es la 2-propanona la cual constituye el 20% del total de estos compuestos. Las cetonas son conocidas por ser las responsables del aroma dulce, floral y a fruta de algunos crustáceos (Cha y col; 1992), proceden principalmente de la degradación de lípidos. Las metilcetonas tales como la 2-propanona y 2-octanona pueden ser el resultado de la β -oxidación de la cadena carbonada seguida de la descarboxilación (Selke y col; 1975); ambas metilcetonas han sido detectadas en cangrejo (Chung y Cadwallader, 1993). La 4-metil-2-pentanona, solamente detectada en producto enlatado, ha sido citada en otros mariscos procesados tales como cangrejo (Matiella y Hsieh, 1990) y camarón (Cha y Cadwallader, 1995).

La 6-metil-5-hepten-2-ona, solamente detectada en gónadas esterilizadas, puede ser el resultado de la degradación oxidativa de carotenoides. Se ha encontrado como producto de la degradación hidrolítica del licopeno en tomate sometido a calentamiento (Buttery y *col*; 1988).

Compuestos nitrogenados.

Tres compuestos nitrogenados (una pirazina, una piridina y una amina) han sido identificados en producto esterilizado. Las pirazinas y piridinas son probablemente generadas térmicamente vía Maillard y reacciones de pirólisis a través de la degradación de Strecker, durante los procesos térmicos de alimentos, a partir de varias fuentes de compuestos nitrogenados como aminoácidos (Wong y Bernhard, 1988; Whitfield, 1992). Las pirazinas, con valores bajos de umbral olfatorio, han sido citadas en la literatura por contribuir al aroma a nueces y tostado característicos de algunos alimentos (Maga y Sizer, 1973). Se cree que son importantes en el aroma de cangrejo (Hayashi, y *col*; 1990) y en el de camarón (Kubota y *col*; 1986). Las piridinas, contribuyen de forma positiva y negativa en la calidad de los alimentos cocinados (Shibamoto, 1989). La piridina se ha detectado también en camarón y anchoa (Cha y Cadwallader, 1995).

Compuestos azufrados.

Se han identificado tres compuestos azufrados, uno de cadena lineal y dos heterociclos. El trisulfuro de dimetilo y el 3-metiltiofeno se detectaron solo en gónadas esterilizadas, mientras que el benzotiazol se encontró solo en muestras frescas. Estos compuestos contribuyen de forma importante al aroma a causa de su bajo umbral olfatorio (Buttery y *col*; 1976), se han encontrado en algunos crustáceos sometidos a procesos térmicos tales como

camarón (Kubota y *col*;1986), cangrejo (Matiella y Hsieh, 1990) y cangrejo de río (Cha y *col*; 1992).

El trisulfuro de dimetilo es uno de los componentes más importantes del aroma de la col, el brécol y la coliflor (Buttery y *col*; 1976).Proceden de la rotura de aminoácidos azufrados.

Presenta un aroma que se asemeja al de la cebolla (Whitfield y *col*; 1981) ha sido identificado en cangrejo de río (Vejaphan, y *col*;1988).

Los tiazoles y tiofenos juegan un papel importante generando aromas similares a los de los productos cárnicos en crustáceos marinos (Kubota y *col*;1986, Vercelloti y *col*;1989), los compuestos azufrados heterocíclicos derivan de las interacciones que tienen lugar entre ácidos grasos insaturados y aminoácidos azufrados durante el calentamiento.

Terpenos.

El único terpeno detectado es el limoneno, tiene una aroma fresco y dulce a cítrico.

La presencia de limoneno puede deberse a la ingestión de algas por el erizo (Hirano y *col*; 1992), también se ha encontrado en pescado (Josephson y *col*; 1984), en camarón (Kubota y *col*;1986) y en cangrejo (Pino y *col*; 1998). El contenido en limoneno sufre una disminución del orden de diez veces durante la esterilización.

Los cambios que tienen lugar durante la esterilización pueden resumirse en los siguientes: (1) aparición de furanos, compuestos nitrogenados y aldehídos de cadena ramificada; (2) el contenido en aldehídos aumenta un 40%; (3) los componentes azufrados aumentan por la esterilización un 50%, (4) el contenido en limoneno sufre una disminución de diez veces.



Tabla 2.I. – Media (n=4) del contenido en compuestos volátiles (%Área \pm SD) en muestras de erizo de mar fresco y enlatado.

N ^o	COMPUESTO	t _r	Tipo(*)	Crudas	Enlatadas
1	2-Metil-1-butanamina	1.592	7		1.9 \pm 0.79
2	3-Metil-4-penten 2-ol	1.717	1	4.1 \pm 0.34	
3	Ciclobutanol	1.734	1		1.5 \pm 0.85
4	Pentano	1.851	5		0.12 \pm 0.06
5	2-Propanona	1.901	6	21.7 \pm 2.78	15.8 \pm 8.40
6	7-Octen-2-ona	2.001	6		6.7 \pm 3.83
7	3-Metilpentano	2.568	5	0.69 \pm 0.61	14.9 \pm 6.11
8	Metilciclopentano	3.169	5		6.4 \pm 1.30
9	1,4-Ciclohexadieno	3.352	5	0.45 \pm 0.05	
10	3-Metilbutanal	3.452	2		0.63 \pm 0.34
11	1-Butanol	3.527	1		5.7 \pm 0.28
12	Ciclopentanol	3.835	1	1.1 \pm 0.92	
13	3-Heptano	4.377	5	0.32 \pm 0.06	
14	Piridina	5.351	7		4.5 \pm 0.11
15	4-Metil-2-pentanona	5.587	6		0.12 \pm 0.08
16	Metilbenceno	5.953	3	5.2 \pm 0.05	9.4 \pm 0.82
17	3-Metiltiofeno	6.104	8		3.4 \pm 0.16
18	2-Furancarboxaldehido	7.78	4		0.51 \pm 0.02
19	4-Hidroxi-4-metil-2-pentanona	8.064	6	2.4 \pm 0.94	1.1 \pm 0.15
20	2-Furanmetanol	8.43	4		2.7 \pm 1.58
21	Etilbenceno	8.963	3	2.3 \pm 0.26	2.2 \pm 1.10
22	1,4-Dimetilbenceno	9.239	3	6.6 \pm 1.04	4.3 \pm 1.22
23	2-Octanona	9.764	6	0.47 \pm 0.34	0.24 \pm 0.09
24	1,2-Dimetilbenceno	10.156	3	4.2 \pm 0.30	1.6 \pm 0.53
25	2,3-Dimetilpirazina	10.399	7		1.2 \pm 0.77
26	Propilbenceno	12.483	3		2.9 \pm 0.52
27	Benzaldehido	12.691	2	0.43 \pm 0.01	0.87 \pm 0.44
28	1-Etil-3-metilbenceno	12.775	3	1.2 \pm 0.87	0.95 \pm 0.57
29	Fenol	13.024	3	1.8 \pm 0.09	
30	Trisulfuro de dimetilo	13.283	8		0.14 \pm 0.02
31	6-Metil-5-hepten-2-ona	13.518	6		1.7 \pm 1.03
32	1-Decanol	13.715	1	3.5 \pm 0.85	
33	2,5,6-Trimetildecano	14.05	5	29.0 \pm 7.43	
34	1,3-Diclorobenceno	14.859	3	0.90 \pm 0.77	
35	DL-Limoneno	15.56	9	2.5 \pm 0.16	0.16 \pm 0.07
36	2-Metilfenol	16.084	3	0.59 \pm 0.07	
37	Nonanal	18.327	2	2.3 \pm 0.14	2.8 \pm 1.56
38	Decanal	22.38	2	1.9 \pm 0.89	3.4 \pm 2.25
39	Benzotiazol	23.36	8	2.3 \pm 0.21	

*(1) alcohol, (2) aldehido, (3) hidrocarburo aromático, (4) furano, (5) hidrocarburo, (6) cetona, (7) c. nitrógeno, (8) c. azufrado (9) terpeno.

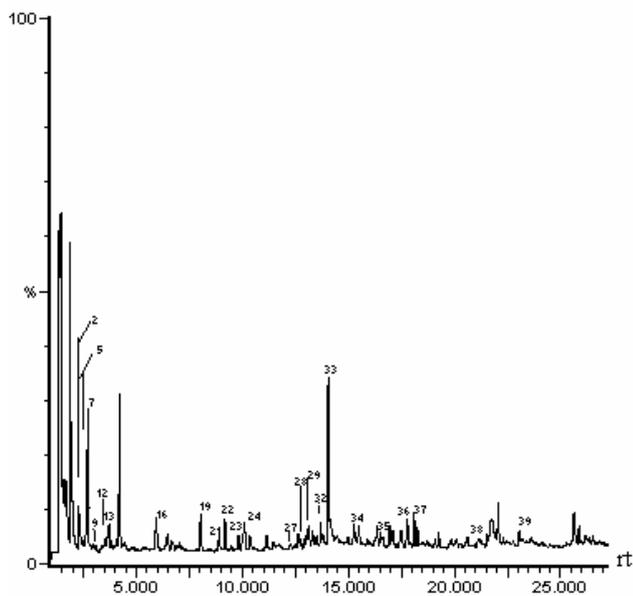


Figura 2.3. - Cromatograma de aromas correspondiente a una muestra fresca de erizo de mar.

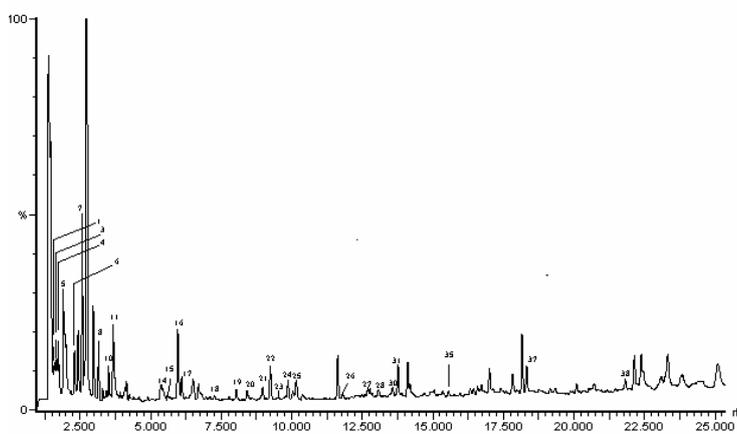


Figura 2.4. - Cromatograma de compuestos aromáticos correspondiente a una muestra de erizo de mar esterilizada.

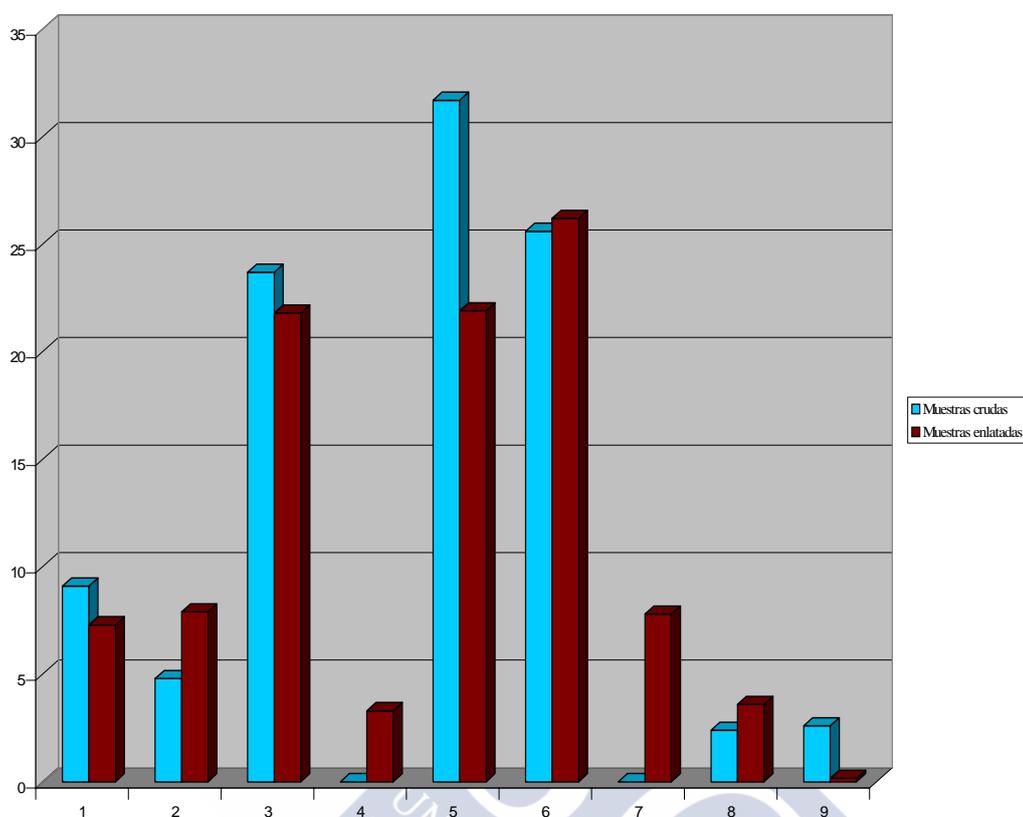


Figura 2.5. - Comparación del contenido total (Area %) de las diferentes grupos químicos en erizo de mar fresco y en conserva. Grupos: 1 alcoholes, 2, aldehidos; 3, compuestos aromáticos, 4; furanos, 5; hidrocarburos, 6; cetonas, 7; compuestos nitrogenados, 8; compuestos azufrados, 9 terpenos.

2.4. -REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

Alberola, J. y Izquierdo, L. (1979). “ La fracción aromática del zumo de naranja. I. Análisis por métodos sensoriales y químicos.” *Rev. Agroquím. Technol. Aliment.* 19(2), 190-202.

Almarcha, M; y Rovira, J. (1994). Aplicaciones a la desorción térmica mediante microondas guiadas en el análisis alimentario. *Técnicas de laboratorio*, No 194, Septiembre 94, pp 699-703.

Belitz, H. D. y Grosch, W. (1988). “Química de los alimentos.” Ed. Acribia, Zaragoza, 2ª edn.Cap. 5.

Borenstein, B.; Bunnell, R.H (1966). “Carotenoids: properties, occurrence and utilization in foods.” *Adv. Food Res.* 15:195-276.

Buttery, R.G. (1981). Vegetable and fruit flavors. In: R. Teranishi, R. A. Flath, H. Sugisawa (Eds.), *Flavor Research*, Marcel Dekker, New York; pp 175-216.

Buttery, R. G; Teranishi, R; Ling, L. C; Flath, R. A; y Stern, D. J. (1988). “Quantitative studies on origins of fresh tomato aroma volatiles.” *J. Agric. Food Chem.* 36: 1247-1250.

Buttery, R. G.; Guadagni, D. G.; Ling, L. C.; Seifert, R. M.; Lipton, W. (1976). “Additional volatile components of cabbage, broccoli and cauliflower.” *J. Agric. Food Chem.* 24: 829-832.

Cha, Y.J.; Cadwallader, K.R. (1995). "Volatile components in salt-fermented fish and shrimp pastes." *J. Food Sci.* 60 (1): 19-25.

Cha, Y.J.; Cadwallader, K.R.; Baek, H.H. (1993). "Volatile flavor components in snow crab cooker effluent and effluent concentrate." *J. Food Sci.* 58 (3): 525-530.

Cha, Y.-J.; Baek, H.-H.; Hsieh, T. C.-Y.(1992). "Volatile components in flavour concentrates from crayfish processing waste." *J. Sci. Food Agric.* 58: 239-248.

Chung, H.Y.; Cadwallader, K.R. (1993). "Volatile components in blue crab (*Callinectes sapidus*) meat and processing by-product." *J. Food Sci.* 58 (6): 1203-1211.

Clarkson, P. y Cooke, M. (1996). "The identification of an unusual component in processed tobacco by gas chromatography with mass spectrometry and atomic emission detection". *Analytica Chimica Acta.* 335:253-259.

García, C.; Berdagué, J. L.; Antequera, T.; López-Bote, C.; Córdoba, J. J.; Ventanas, J. (1991). "Volatile components of dry cured Iberian ham." *Food Chem.* 41: 23-32.

Hayashi, T.; Ishii, H.; Shinoara, A. (1990). "Novel model experiment for cooking flavor research on crab leg meat." *Food Rev. Int.* 6: 521-536.

Ho, C.T.; Lee, K. N.; Jin, Q.Z. (1983). "Isolation and identification of volatile flavor compounds in fried bacon." *J. Agric. Food Chem.* 31: 336-342.

Hirano, T.; Zhang, C.-H.; Morishita, A.; Suzuki, T.; Shirai, T.(1992). *Nippon Suisan Gakkaishi.* 58(3), 547-557.

Josephson, D.B.; Lindsay, R.C.; Stiber, D.A.(1984). "Variations in the occurrences of enzymically derived volatile aroma compounds in and freshwater fish." *J. Agric. Food Chem.* 32: 1344-1347.

Kawakami, M; Ganguly, S. N; Banerjee, J. y Kobashayi, A.(1995) "Aroma composition of oolong tea and black tea by brewed extraction method and characterizing compounds of Darjeeling tea aroma". *J.Agric.Food Chem.*43:200-207.

Kubota, K.; Shijimaya, H.; Kobayashi, A. (1986) "Volatile components of roasted shrimp." *Agric. Biol. Chem.* 50: 2867-2873.

Maga, J.A.; Sizer, C.E.(1973). "Pyrazines in foods: A review." *J. Agric. Food Chem.* 21: 22-30.

Mateos, A. y Carbonell, E. (1990). Análisis de la fracción aromática de alimentos. "Técnicas de extracción y concentración." *Rev. Agroquím. Technol. Aliment.* 30/4, 431-444.

Matiella, J. E.; Hsieh, T. C.-Y. (1990). "Analysis of crabmeat volatile compounds." *J. Food Sci.* 55 (4): 962-966.

Medina, I; Suarez, J. J. y Martinez, J. L. (1994). "Aromas alimentarios (I)". *Alimentación, Equipos y Tecnología*. nº 6, 87-92.

Morales, A. L; Albarracin, D; Rodríguez, J; Duque, C; Riaño, L. E. y Espitia, J. (1996). "Volatile constituents from Andes Berry (*Rubus glaucus* Benth)". *J. High Resol. Chromatogr.* 19:585-587.

Narain, N; Hsieh, T. C. Y; y Johnson, C. H. (1990). "Dynamic Headspace Concentration and Gas Chromatography of Volatile Flavor Components in Peach." *J. Food. Sci.* 55 (5): 1303-1307.

Olías, J. M.; Pérez, A. G.; Ríos, J. J.; Sanz, L. C. (1993). "Aroma of virgin olive oil: biogenesis of the "green" odor notes". *J. Agric. Food Chem.* 41, 2368-2373.

Padrayuttawat, A; Tamura, H. y Yamao, M. (1996). "A split injection system for the analysis of purge and trap headspace of the volatile components in *Citrus sudachi*". *J. High Resol. Chromatogr.* 19:365-369.

Peralta, R; Shimosa, M y Osajima, Y. (1996). "Further identification of volatile compounds in fish sauce". *J. Agric. Food. Chem.* 44: 3606-3610.

Pino, J. A; Roncal, E; Navarro, G; y Rosado, A. (1998). "Volatile Components in Blue Crab (*Callinectes sapidus*) Flavor Concentrate." *Alimentaria*, Mayo 98/81, 81-83.

Pippen, E.L.; Mecchi, E.P.; Nonaka, M. (1969). "Origin and nature aroma in fat of cooked poultry." *J. Food Sci.* 34: 436-442.

Rapp, A (1990). "Natural flavours of wine: correlation between instrumental analysis and sensory perception." *Fresenius. J. Anal. Chem.* 337, 777-85.

Riedel, K; Ruppert, T; Conze, C; Scherer, G. y Adlkofer, F. (1996). "Determination of benzene and alkylated benzenes in ambient and exhaled air by microwave desorption coupled with gas chromatography-mass spectrometry". *J. Chromatogr A.* 719:383-389.

Seik, T. J; Albin, I. A; Sather, L. A. y Lindsay, R. C. (1977). "Comparison of flavor thresholds of aliphatic lactones with those of fatty acids, esters, aldehydes, alcohols and ketones". *Journal of Dairy Science*, 54: 1-4.

Selke, E.; Rohwedder, W.K.; Dutton, H.J. (1975). "Volatile components from tristearin heated in air". *J. Am. Oil Chem. Soc.*; 52: 232-235.

Shibamoto, T.(1989). "Volatile flavor chemicals formed by the Maillard reaction." In *Thermal Generation of Aromas*, eds Parliment, T.H.; McGorin, R.J.; Ho, C.T. American Chemical Society, Washington, p.134-142.

Shimoda, M; Peralta, R. R. y Osajima, Y. (1996). "Headspace Gas Analysis of Fish Sauce." *J. Agric. Food Chem.*; 44: 3601-3605.

Stashenko, E. E; Quiroz, Prada, N. Y Stashenko, E. E; Quiroz, Prada, N. y R. Martinez, J. (1996). "HRGC/FID/NPD and HRGC/MSD study of Colombian ylang.ylang (*Cananga odorata*) oils obtained by different extraction techniques". *J. High Resol. Chromatogr.* 19: 353-358.

Tanchotikul, U. y Hsieh, C.Y.T. (1989). "Volatile flavor components in crayfish waste". *J. Food Sci.* 54 (6):1515-1520.

Van Ruth, S. M. y Roozen, J. P. (1994). Gas chromatography/sniffing port analysis and sensory evaluation of commercially dried bell peppers (*Capsicum annuum*) after rehydration". *Food Chem.*, 51, 165-170.

Vejaphan, W.; Hsieh, T.; Williams, S. S. (1988). "Volatile flavor components from boiled crayfish (*Procambarus clarkii*) tail meat." *J. Food Sci.* 53 (6):1666-1670.

Vercelloti, J. R; Kuan, J. W; Spanier, A.M; St Angelo, A. J: (1989). "Thermal generation of sulfur-containing flavor compounds in beef". Thermal generation of aromas. Ed Parliament TH, Mc Gorrin RJ Ho CT. Cap. 42. American Chemical Society Washington, D. C.

Watanabe, K.; Sato, Y. (1971). "Some alkyl-substituted pyrazines and pyridines in the flavor components of shallow fried beef." *J. Agric. Food Chem.* 19: 1017-1019.

Whitfield, F. B. (1992). "Volatiles from interactions of Maillard reactions and lipids." *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 31:1-58.

Whitfield, F. B.; Freeman, D.J.; Bannister, P.A.(1981). "Dimethyl trisulphide: an important off-flavor component in the royal red prawn (*Hymenopenaeus sibogae*)." *Chem. Ind. London.* 3: 692-693

Wong, J.M.; Bernhard, R.A.(1988). "Effect of nitrogen source on pyrazine formation." *J.Agric. Food. Chem.* 36: 123-129.

Yasuhara, A.; Shibamoto, T. (1995). "Quantitative analysis of volatile aldehydes formed from various kinds of fish flesh during heat treatment." *J.Agric Food Chem.* 43: 94-97.





3. - VITAMINAS HIDROSOLUBLES

3.1. - INTRODUCCIÓN.

Las vitaminas son componentes esenciales de la dieta, cuyo aporte adecuado es imprescindible para el mantenimiento normal de las diversas funciones del organismo humano. Que no se destruyan o pierdan a lo largo de los procesos de preparación de los alimentos tiene, por tanto, gran importancia. Tales pérdidas de vitamina pueden producirse tanto por reacciones químicas, que conducen a productos inactivos, como por lixiviación, especialmente de vitaminas hidrosolubles, por ejemplo por procesos de escaldado o cocción, pues en ellos las aguas de cocción no se utilizan (Belitz y Grosch, 1988).

3.1.1. - Tiamina.

La tiamina, o vitamina B₁, está formada por una pirimidina sustituida unida a un tiazol sustituido por un grupo metileno. Se encuentra ampliamente distribuída tanto en el reino vegetal como en el animal, dado que desempeña un papel clave como coenzima en el metabolismo intermediario de los α -cetoácidos y de los carbohidratos. Por ello, la tiamina se halla en alimentos en diversas formas, entre ellas tiamina libre, éster del ácido pirofósforico (cocarboxilasa) y unida al apoenzima respectivo (Fennema, 1993).

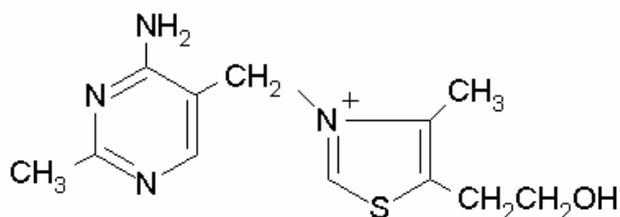


Figura 3.1. - Estructura de la tiamina.

La vitamina B₁ se halla ampliamente distribuida en plantas, tanto en el pericarpio como en el germen de cereales (trigo), en levaduras, hortalizas, legumbres y patatas; también abunda en la carne de cerdo y vacuno, en el pescado y los huevos, así como en los órganos animales.

Las cantidades de vitamina B₁ que conviene ingerir con la dieta varían según la edad, el sexo, la situación fisiológica (embarazo o lactancia), la ingesta de hidratos de carbono o la existencia de situaciones patológicas que impidan una correcta absorción. (Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, 1993). Así las necesidades para el adulto son de 1.2 mg/día para los varones y 1.1 mg/día para las mujeres; durante el embarazo se recomienda un aumento de 0.3 mg/día y un suplemento de 0.4 mg/día durante la lactancia. (Mahan y Escott-Stump, 2001).

3.1.2. – Riboflavina.

Riboflavina es el nombre común del compuesto químico [7,8-dimetil-10-(1'-D-ribitol) isoaloxazina], formando un sistema tricíclico con cuatro nitrógenos en posiciones 1,3,5 y 10. (Figura 3.2). Es una flavina que puede ser sintetizada por algunos hongos y bacterias, pero los organismos superiores, en especial los humanos y el resto de los mamíferos, no poseen esta capacidad (Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, 1993). En la naturaleza se encuentra habitualmente fosforilada y funciona como una coenzima, una de sus formas es el flavinmononucleótido (FMN) y la otra flavin-adenin-dinucleótido (FAD). Las enzimas asociadas a esta vitamina se denominan flavoproteínas y actúan como agentes transfirientes de hidrógeno en compuestos tales como aminoácidos y piridinucleótidos reducidos (Fennema, 1993).

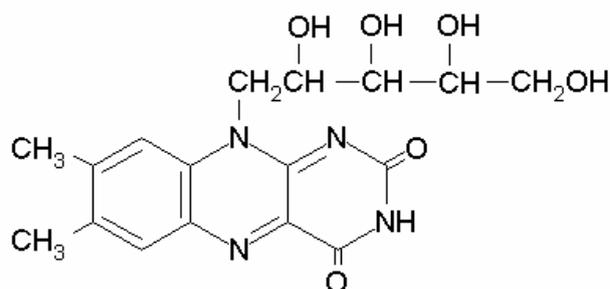


Figura 3.2. - Estructura de la riboflavina.

Las ingestas recomendadas del hombre adulto son de 1.2 mg/día. En situaciones fisiológicas de gestación y lactancia se recomienda incrementar los niveles con 0.3 y 0.5 mg/día, respectivamente. Difícilmente se produce una deficiencia si se consume una alimentación variada y normal, pues los depósitos de riboflavina del organismo son muy estables y un aporte deficiente solamente disminuyen un 30-50%.

Las principales fuentes de riboflavina son la leche y productos lácteos, huevos, diversas clases de hortalizas, levaduras, productos cárnicos, especialmente aquellos que contienen vísceras (corazón, hígado, riñón), además del hígado de pescado y las huevas

Tanto la tiamina como la riboflavina se han determinado por una amplia variedad de técnicas, de las cuales las más frecuentemente utilizadas son las cromatográficas: capa fina (Perisic y Vujicic, 1997) y HPLC (Abdel-Kader, 1992; Russell y Vanderslice, 1992; Sims y Shoemaker, 1993; Arella y col.; 1996), esta última técnica permite un análisis rápido, simple y selectivo para la determinación de vitaminas. Las ventajas del HPLC en comparación con otras técnicas analíticas son las pequeñas cantidades de solvente que se emplea, la alta eficacia, el fácil acoplamiento con otras técnicas y finalmente

las pequeñas cantidades de muestra. Este método ofrece la posibilidad de determinar varias vitaminas en una sola inyección con la misma columna (Papadoyannis y col; 1997) algunos métodos utilizan detección UV (Wimalarisi y Wills, 1985; Abala-Hurtado y col; 1997) otros electroquímica (Hou y Wang, 1990) y otros fluorimétrica (Fellman y col; 1982; Augustin, 1984; Fernando y Murphy, 1990; Abdel-Kader, 1992; Russell y Vanderslice, 1992; Sims y Shoemaker, 1993; Arella y col; 1996). Los métodos que utilizan detección UV presentan poca sensibilidad, y solamente son aplicables a alimentos que contengan cantidades relativamente altas de estas vitaminas, por el contrario los métodos que utilizan detección por fluorescencia además de tener mayor selectividad ofrecen la ventaja que la presencia de sustancias interferentes es menor que en la detección UV (Fellman y col; 1982).

Además la riboflavina también se determina por fluorimetría, midiendo la típica fluorescencia verde-amarillenta y microbiológicamente utilizando *Lactobacillus casei* (Fennema, 1993).

3.1.3. - Ácido ascórbico.

Químicamente el ácido ascórbico es un compuesto bastante sencillo. Es un derivado lactónico del ácido hexurónico y se corresponde con una forma oxidada de glucosa. Los diferentes grados de oxidación que experimenta, dan lugar a derivados igualmente activos destacando entre ellos, el ácido L-dehidroascórbico (Consejo General de Colegios Oficiales Farmacéuticos 1993).

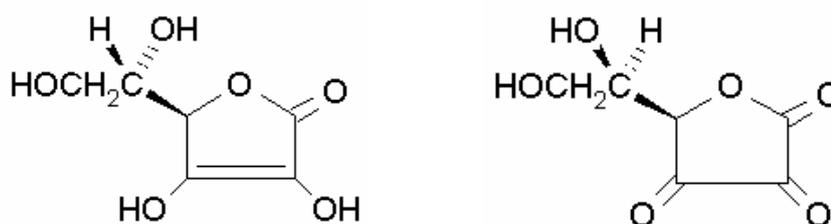


Figura 3.3. -Estructura del ácido ascórbico y dehidroascórbico.

Hay estudios que sugieren que ingestas adecuadas de vitamina C inhiben el crecimiento de cierto tipo de tumores (Block y Menkes, 1989). Además el ácido ascórbico está implicado en diferentes sistemas enzimáticos, en la formación de colágeno, en la neurotransmisión y en la respuesta inmune (Martínez, 1998). Debido a ello la determinación de esta vitamina en alimentos, plantas, tejidos animales, etc. ha cobrado una gran importancia en los últimos años.

En la dieta humana el ácido ascórbico es principalmente aportado por alimentos de origen vegetal aunque también está presente en alimentos de origen animal incluyendo hígado (Mori y col; 1998) y pescado (Dabrowski y Blom, 1994).

Las ingestas diarias de vitamina C que se recomiendan son de 60 mg/día para los adultos debiéndola aumentar en 10 mg/día durante el embarazo y 30 mg diarios durante los seis primeros meses del periodo de lactancia y 35 mg durante los segundos seis meses (National Research Council, 1991).

Se han desarrollado numerosos métodos para el análisis de ácido ascórbico incluyendo colorimétricos (Carr y col; 1983), espectrofotométricos

(Dabrowski y Hinterleitner, 1989), potenciométricos (Esteve y col; 1995), espectrofluorométricos (Sanchez-Mata y col; 1989), y cromatográficos (Miller y col; 1980; Wang y Seib, 1990; Ito y col; 1995; Capellmann y Bolt, 1995; Merchie y col; .1995; Nelis y col; 1997; Kall y Andersen, 1999). Dentro de estos últimos los métodos de HPLC han recibido particular atención. Los métodos de HPLC con detección UV (Ito y col; 1995) o electroquímica (Wang y Seib, 1990; Merchie y col; 1995) se consideran insuficientemente específicos y pueden verse afectados por sustancias interferentes. Por el contrario, la detección por fluorescencia (después del tratamiento de la muestra para obtener un derivado fluorescente del ácido ascórbico) muestra una buena especificidad y sensibilidad (Capellmann y Bolt, 1992; Mori y col; 1998). Los diferentes tipos de columnas empleados para la determinación de ácido ascórbico incluyen las ampliamente utilizadas C18 (Capellmann y Bolt, 1992; Mori y col; 1998; Kall y Andersen, 1999), las columnas de ión –exclusión (Ito y col; 1995), Dionex Da-X-8-II resinas (Vanderslice y Higgs, 1984) y las de grupos amino (Albretch y Schafer, 1990).

3.2. - PARTE EXPERIMENTAL.

3.2.1. -Reactivos.

-Patrones de vitaminas:

- Ácido ascórbico. MERCK Art. 127. CAS 50-81-7.
- Tiamina SIGMA Art. T-4625. CAS 67-03-8.
- Riboflavina SIGMA Art. R-4500. CAS 83-88-5.

-Enzimas:

- Claradiastasa. BIOCHEMIKA FLUKA Art. 27540.
CAS 9001-11-0.

-Reactivos de grado para el análisis:

- 1,2-Fenilendiamina MERCK Art. 7243.
- Carbón activo MERCK Art. 9624.
- Acetato sódico PANREAC Art. 141633.
- Acetato sódico trihidratado MERCK Art. 6267.
- Acetato amónico MERCK Art. 945.
- Hexacianoferrato (III) potásico. BIOCHEMIKA FLUKA Art. 60299.
- Hidróxido sódico 97%. QUIMON Art. 211687.

-Solventes de grado para HPLC:

- Metanol MERCK Art. 1230.
- Acetonitrilo MERCK Art. 1648.

-Solventes de grado para el análisis:

- Ácido metafosfórico MERCK Art. 1805.

- Ácido clorhídrico fumante 37% MERCK Art. 1789.
- Ácido orto-fosfórico 85% MERCK Art. 1805.
- Etanol absoluto MERCK Art. 1170.
- Ácido acético glacial 95% VORQUIMICA.

El agua utilizada para todas las soluciones se obtuvo a partir de un sistema de purificación del agua Mili-Q (Millipore).

3.2.2. - Material y aparatos.

a) Determinación de tiamina y riboflavina:

- Papel de filtro Whatman N^o 41.
- Cartuchos C18 Sep Pak Cartrid Waters
- Cromatógrafo de líquidos Hewlett Packard equipado con una bomba cuaternaria HP1100, válvula Rheodyne y bucle de inyección de 20 μ L (Figura 3.4)
- Detector Fluorescence array Detector HP1100
- Columna Spherisorb C18 ODS2 de 25x0.4cm y tamaño de partícula 5 μ .
- Software HPCHEM para cromatografía líquida Rev.A.06.01 [403].
- Ordenador Hewlett-Packard HP vectra PC con 64 MB de memoria RAM y microsoft Windows NT versión 4.0.

b) Determinación de ácido ascórbico:

Método HPLC-UV

- “Vortex” STUART SCIENTIFIC SA6.
- Cromatógrafo de líquidos Spectra-Physics, equipado con una bomba SP8800, válvula Rheodyne y bucle de inyección de 20 μ L.
- Detector UV-Vis Spectra Focus Forward Optical Scanning.

- Columna Kromasil 100, C18 de 25x 0.4cm y tamaño de partícula 5 μ .
- Software PC1000 versión 3.0.
- Ordenador 386 IBM con 4MB de memoria RAM, con sistema operativo "operating System/2 versión 1.2.

Método HPLC-FLUORESCENCIA

- Cromatógrafo de líquidos Hewlett Packard equipado con una bomba cuaternaria HP1100, válvula Rheodyne y bucle de inyección de 20 μ L.
- Detector Fluorescence array Detector HP1100
- Columna Kromasil 100 C18 de 25x0.4cm y tamaño de partícula 5 μ .
- Software HPCHEM para cromatografía líquida Rev.A.06.01 [403].
- Ordenador Hewlett-Packard HP vectra PC con 64 MB de memoria RAM y microsoft Windows NT versión 4.0.



Figura 3.4. - Equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

3.2.3. - Extracción de la muestra.

a) Tiamina y riboflavina.

Las muestras (2.5g) se colocan en matraces erlenmeyer de 100 mL conteniendo 15 mL de ácido clorhídrico 0.1N y se calientan en un baño de agua a 100 °C durante 30 min. Después de enfriarlas a temperatura ambiente se ajusta el pH de las mismas con acetato sódico 2.5M. A continuación se adiciona 1.25 mL de una solución acuosa de claradiastasa 6%(p/v) y se incuban en una estufa 3 horas a 50 °C. Después de que las muestras hayan enfriado se llevan a 25 mL con agua MILI-Q. A continuación se filtran a través de un filtro Whatman N° 41.

La tiamina es transformada en tiocromo añadiendo a 2.5 mL del extracto filtrado 1.25 mL de ferricianuro potásico al 1% preparado en una solución acuosa de hidróxido sódico al 15%; después de un minuto para que tenga lugar la oxidación se añaden 0.25 mL de ácido orto-fosfórico al 85%.

El extracto es purificado y concentrado en un cartucho Sep-Pak C18 (Waters Associates). Para acondicionar la mini-columna, primeramente se lava con 5mL de metanol seguido de 5mL de acetato amónico 0.005M ajustado a pH 5.0 con ácido acético, posteriormente se pasan 5 mL de la muestra a través del cartucho C18, a continuación se lava con 5 mL de acetato amónico 0.005M y finalmente las vitaminas se eluyen con 5 mL de la fase móvil. Esta solución se filtra a través de un filtro de tamaño de poro de 0.22 µm (Millipore) y a continuación se inyecta en el cromatógrafo.

b) Ácido ascórbico.

Método HPLC-UV.

A 2 g de muestra se añaden 6 mL de una solución acuosa de ácido metafósforico al 4.5% y se mezclan en el “vortex” durante 2 min, a continuación se centrifuga 5 min a 1100 rpm. Se retira el sobrenadante y el

residuo se extrae por el mismo procedimiento otras dos veces. Se juntan los 3 sobrenadantes resultantes de sendas extracciones y se llevan a 25 mL con agua MILI-Q. Una alícuota de 2 mL de esta solución se filtra a través de un filtro de tamaño de poro de 0.22 μm (Millipore) y a continuación se inyecta en el cromatógrafo con detección UV.

Método HPLC-FLUORESCENCIA.

Otra alícuota de 2 mL se filtra a través de un filtro de 0.22 μm (Millipore) antes de adicionar 200 mg de carbón activo para oxidar el ácido ascórbico a dehidroascórbico. Se deja durante 30 min y a continuación se filtra. 0.5 mL del filtrado se mezclan con 0.5 mL de acetato sódico al 50% y se dejan durante 15 min, a continuación se mezcla con 0.5 mL de 1,2-fenilendiamina y se deja en la oscuridad 35 min para que se complete la reacción, (Figura 3.5) finalmente se inyecta en el cromatógrafo con detección de fluorescencia.

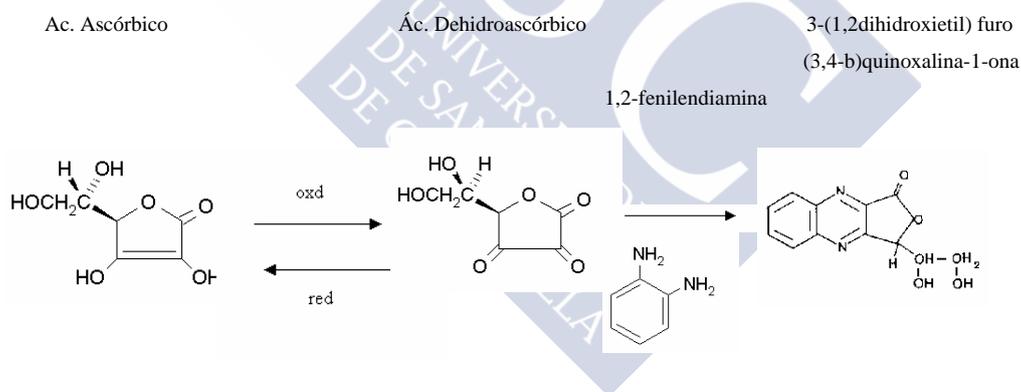


Figura 3.5. - Reacción del ácido ascórbico para formar un compuesto fluorescente.

3.2.4. - Preparación de los patrones.

Se prepara una solución madre de vitamina B₁ en etanol al 20% y de vitamina B₂ en ácido acético 0.02N, se toman 10 mL de cada solución y se llevan a 100 mL con agua destilada, la disolución resultante es la solución madre de ambas vitaminas. A continuación se procede a la derivatización de la tiamina, habiendo comprobado previamente que el proceso de derivatización no afecta a la riboflavina. En la derivatización a 10 mL de la solución de las vitaminas se le añade 7.5 mL de solución oxidante, preparada llevando 1 mL de ferricianuro potásico al 1% hasta 25 mL con hidróxido sódico al 15%, seguidamente se agita 10 s y se deja 1min para que se complete la oxidación, se añaden 7.5 mL de ácido clorhídrico 3.75N y se pasa por la mini-columna dicha disolución. El acondicionamiento de la mini-columna viene descrito en el apartado de la extracción, en este caso en lugar de hacer pasar la muestra se hace pasar el patrón. Para el ácido ascórbico se prepara la solución madre en una disolución acuosa de ácido metafosfórico al 4.5%.

En ambos casos se toman las porciones necesarias para establecer una escala de tal forma que las concentraciones de las tres vitaminas presentes en la muestra queden en el rango de la escala establecida.

3.2.5. - Condiciones de trabajo.

a) Tiamina y riboflavina:

-Fase móvil: Consta de una mezcla de acetato amónico 0.005M (ajustado a pH 5.0 con ácido acético) y metanol (72:28).

-Flujo: 1.450 mL/min.

-Detección: B₁ λ_{exc} 370nm, λ_{em} 435nm; B₂ λ_{exc} 370nm, λ_{em} 520nm.

El cambio de longitudes de onda se efectúa a los 6 min.

b) Ácido ascórbico:

Método HPLC-UV.

-Fase móvil: Agua MILI-Q ajustada a pH 2.2 con ácido metafosfórico.

-Flujo: 1 mL/min.

-Detección: 245 nm.

Método HPLC-FLUORESCENCIA:

-Fase móvil: Consta de una mezcla de metanol y ácido metafosfórico 0.1% (7:3).

-Flujo: 1 mL/min.

-Detección: λ_{exc} 350nm, λ_{em} 430nm.

3.2.6. -Cuantificación.

Para la cuantificación se establece una recta de calibrado, de cuatro puntos, en función de la relación de las áreas de los picos con las concentraciones de los correspondientes patrones. Las ecuaciones del tipo $y=a+bx$, obtenidas para la vitaminas B₁, B₂, y vitamina C fueron respectivamente: $y=0.0734+202.2x$; $y=1.1081+65.5x$; $y=6.1942+7162.8x$ y los coeficientes de correlación; 0.9993, 0.9993 y 0.9996.

3.3. - RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

3.3.1. -Tiamina y riboflavina.

El método cromatográfico utilizado es muy similar al propuesto por Sims y Shoemaker, 1993 para la determinación conjunta de ambas vitaminas en alimentos, las principales diferencias están en la extracción de la muestra. En el método que se presenta es necesario un paso que incluye una incubación con un enzima después de la extracción y antes de la derivatización. Se eligió claradiastasa por ser más adecuada para la matriz que se estudia; además en otros estudios como los llevados a cabo por Hasselmann y *col*; 1989 al utilizar takadiastasa observaron que las reproducibilidades eran pobres.

Con el uso de los cartuchos Sep Pak C18 se consiguió una concentración rápida y selectiva de la tiamina y la riboflavina y esto unido a la alta sensibilidad del detector de fluorescencia permitió determinar ambas vitaminas a pesar de encontrarse la tiamina a niveles relativamente bajos.

Se ensayaron diferentes flujos 0.8, 1.250 y 1.450 mL/min. Con el flujo más alto se reducía el tiempo de análisis y además se conseguía una mejor resolución, por ello se eligió para realizar los análisis.

La figura 3.6 muestra un cromatograma de vitaminas B₁ y B₂ correspondiente a una muestra de erizo de mar.

Las longitudes de onda óptimas se determinaron haciendo un scan de excitación y otro de emisión de las vitaminas disueltas en la fase móvil, así

como contrastando los valores encontrados con los que aparecen en la bibliografía.

La figura 3.7 a b c d corresponde a los espectros de emisión y de excitación de la tiamina y la riboflavina.

Los límites de detección determinados según las normas de ACS (1980) fueron 0.00875 ng/mL para la tiamina y 0.07967 ng/mL para la riboflavina.

En el estudio de la precisión del método para la determinación de las vitaminas se repitió el proceso completo con ocho porciones de la misma muestra. Las RSD % obtenidas fueron de 2.06 para la tiamina y 2.32 para la riboflavina. En los ensayos de precisión de la medida una misma alícuota se inyectó ocho veces obteniéndose una RSD % de 1.73 para la tiamina y 1.82 para la riboflavina.

Para el estudio de la recuperación del método, se sobrecargó la muestra con concentraciones conocidas de los correspondientes patrones, los resultados que se obtuvieron, expresados en %, fueron 91.33 para la vitamina B₁ y 92.00 para la vitamina B₂.

En la Tabla 3.I se representa el contenido en vitaminas B₁ y B₂ en muestras frescas y esterilizadas. Al aplicar el test-t para comparar el contenido en tiamina y riboflavina en ambos tipos de muestra se encontró que las diferencias eran significativas. El contenido en riboflavina es relativamente alto, del orden de 800 µg/100g de muestra, pudiendo

considerar las gónadas de erizo de mar como una buena fuente de dicha vitamina.

Se ha observado que la tiamina es inestable con el calor mientras que la riboflavina es más estable, así durante el proceso de esterilización al que se someten las gónadas durante el enlatado el contenido en tiamina disminuye un 35% frente a un 4% de la riboflavina. Estos resultados confirman estudios previos como los llevados a cabo por Al-Khalifa y Dawood, 1993.

El contenido más bajo en tiamina y riboflavina en alimentos procesados se atribuye a las altas temperaturas que se alcanzan en los diferentes tratamientos a los que se someten (Sarkar y col;1998).

Comparando el contenido en vitaminas B₁ y B₂ en erizo de mar, *Paracentrotus lividus*, con otros organismos acuáticos citados en diferentes trabajos, se vió que la cantidad de riboflavina encontrada en el erizo de mar es superior a la cantidad presente en *Engranulis encrasicholus* (López y López-Leyton y col; 1998) y en *Hemicentrotus pulcherrimus* (Shimada y col; 1993) sin embargo el contenido en tiamina es inferior que el encontrado en *Epinephelus morio* (Kim y col; 1998) y en *H. Pulcherrimus* (Shimada y col; 1993).

3.3.2. - Ácido ascórbico.

Con relación a la vitamina C al igual que para las vitaminas B₁ y B₂, con el fin de seleccionar la longitud de onda óptima para el método HPLC-UV se llevó a cabo un scan con un patrón de ácido ascórbico, la absorbancia más alta se encontró que era a 245 nm y por ello se eligió como λ de trabajo (Sánchez- Mata y col; 2000).

Para la determinación del ácido ascórbico en erizo de mar con detección UV se aplicó el método de Vázquez-Oderiz *y col;* 1994 con pequeñas modificaciones en el proceso de extracción y en el flujo (1.0 frente a 0.5 mL/min). El flujo más alto acortaba el tiempo de análisis y mejoraba la resolución cromatográfica.

El límite de detección calculado según las normas de la ACS fue 0.19 µg/mL.

La precisión del método, estimada como la desviación estándar relativa de ocho alicuotas de una misma muestra sometidas al proceso completo fue 6.35%.

No obstante, la resolución conseguida con este método no fue óptima debido a la presencia de picos interferentes. En la figura 3.8 se muestra un cromatograma correspondiente a una muestra de erizo de mar.

En el método de HPLC-FLUORESCENCIA, la muestra se trató primeramente con carbón activo para oxidar el ácido ascórbico a dehidroascórbico y a continuación se derivatizó con 1,2.fenilendiamina para obtener un derivado fluorescente del ácido dehidroascórbico, 3- (1,2,-dihidroxietil)-furo (3,4-b)quinoxalina-1-ona (Capellmann y Bolt, 1992; Mori *y col;* 1998).

Las longitudes de onda óptimas de excitación y emisión se determinaron haciendo un scan con los patrones, de la misma forma que se había hecho para las otras vitaminas.

En ensayos preliminares se probaron diferentes fases móviles encontrándose que con metanol: ácido metafosfórico 0.1% (7:1) se obtenía una resolución mejor que cuando se utilizaba acetonitrilo:agua MILI-Q ajustada a pH 2.2 con ácido metafosfórico (50:50). En estas condiciones las RSD % obtenidas para la precisión de la medida y del método fueron 0.47% y 0.61% respectivamente.

El límite de detección calculado según las normas de la ACS (1980) fue 0.082 µg/mL.

Mediante el Student's t test se comparó el contenido en ácido ascórbico en muestras de erizo por los dos métodos, HPLC-UV y HPLC-FLUORESCENCIA, comprobándose que las diferencias no eran significativas.

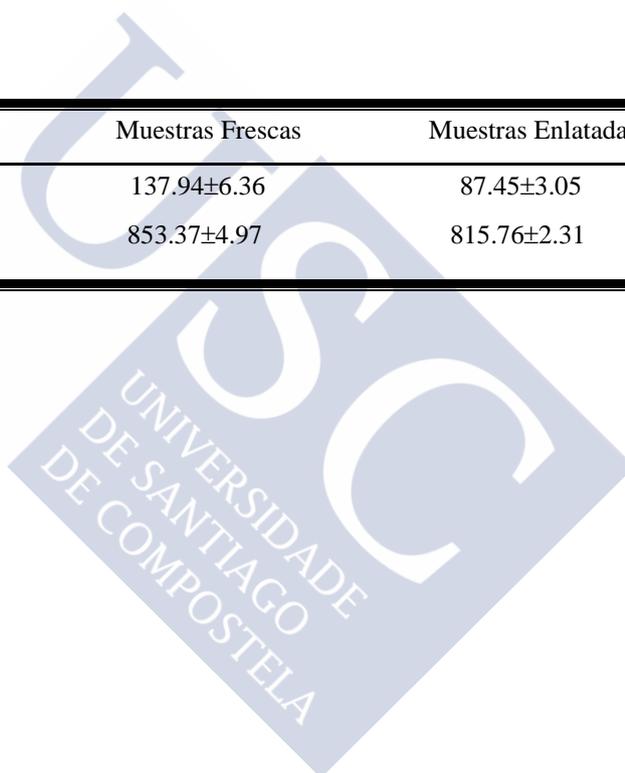
Los porcentajes de recuperación, evaluados sobrecargando la muestra con patrones de concentración conocida están comprendidos en el rango 97.82-99.74%.

El contenido en ácido ascórbico expresado como (mg/100g de muestra±SD) fue de 26.57 en muestras frescas y 14.26 en muestras enlatadas. Estos valores son más altos que los encontrados en algunos alimentos de origen vegetal tales como la achicoria y las endivias (Belitz y Grosch, 1998) y del orden de los encontrados en trucha irisada (Dabrowski, 1994). El contenido más bajo en ácido ascórbico en muestras en conserva se debe a las altas temperaturas alcanzadas durante la esterilización (Robinson, 1987). Como sucede en el caso de las vitaminas B₁ y B₂ los tratamientos a los que se someten los alimentos disminuyen el contenido en vitamina C (Tapadia y col; 1995; Shirsat y Thomas, 1998; Doudu y col; 1999).

En conclusión, los resultados indican que el método HPLC-FLUORESCENCIA para la determinación de ácido ascórbico (después de la oxidación y derivatización) es más eficaz que el método con detección UV, con mejor sensibilidad, especificidad y diez veces mejor reproducibilidad.

Tabla 3.I.-Concentraciones ($\mu\text{g}/100\text{g}$ de muestra) de vitamina B₁ y B₂ en muestras frescas y esterilizadas. Los valores que se presentan son promedios (\pm SD) para ocho muestras diferentes.

Compuesto	Muestras Frescas	Muestras Enlatadas
Tiamina	137.94 \pm 6.36	87.45 \pm 3.05
Riboflavina	853.37 \pm 4.97	815.76 \pm 2.31



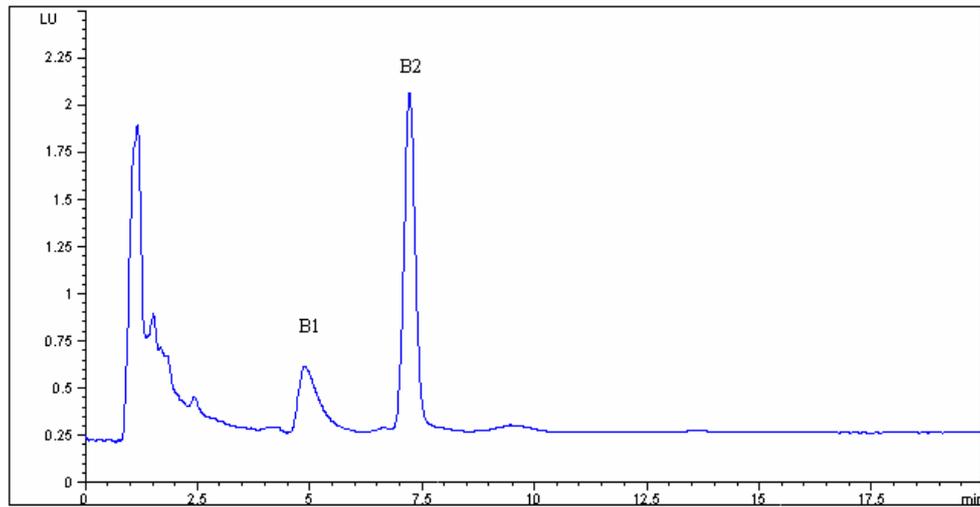


Figura 3.6. - Cromatograma de vitaminas B₁ y B₂ correspondiente a una muestra de erizo de mar.

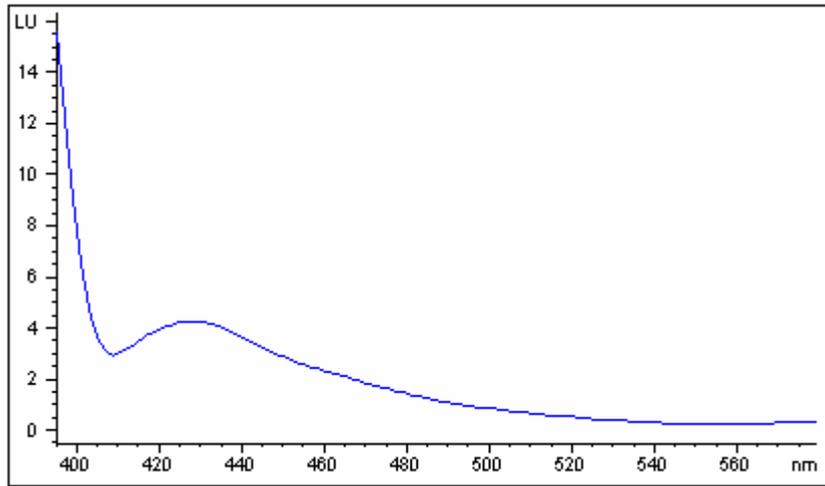


Figura 3.7.a. - Espectro de emisión de la tiamina.

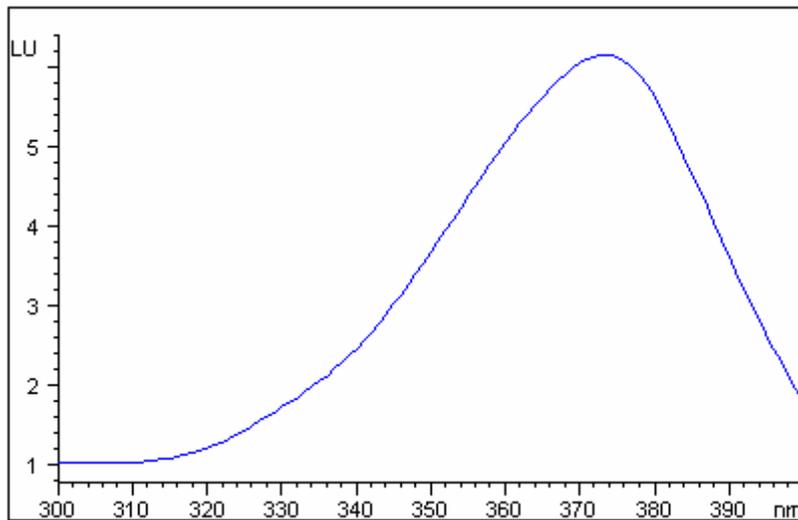


Figura 3.7.b. - Espectro de excitación de la tiamina.

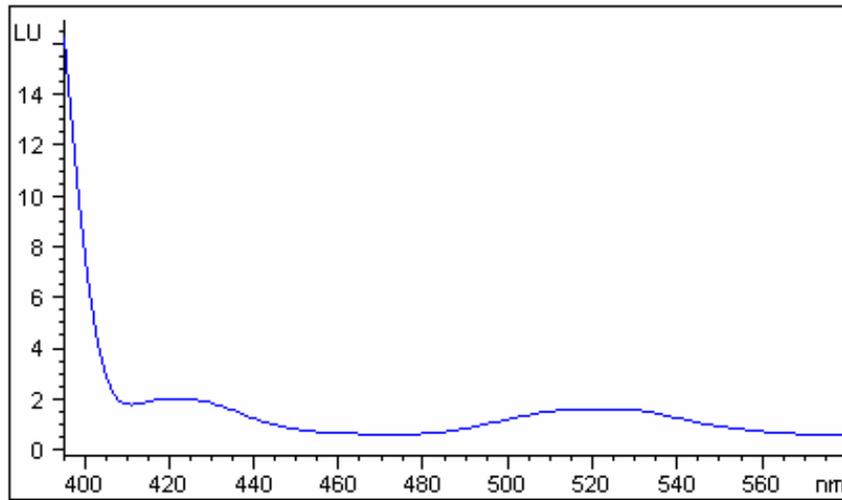


Figura 3.7.c. - Espectro de emisión de la riboflavina.

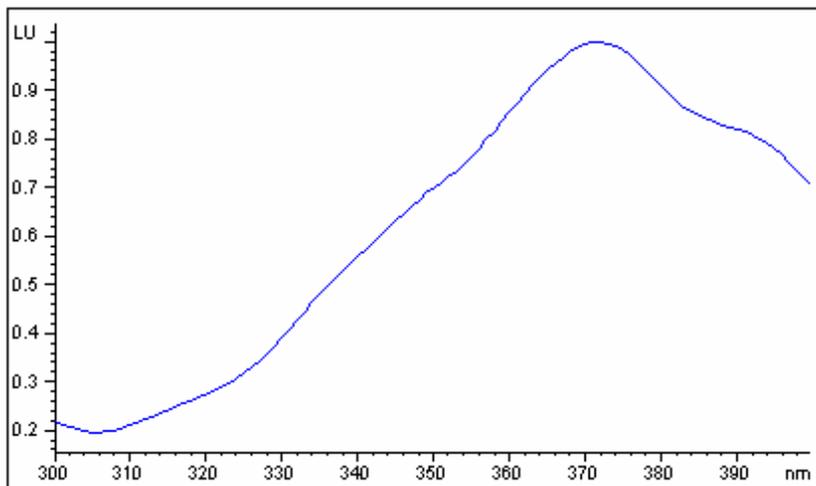


Figura 3.7.d. - Espectro de excitación de la riboflavina.

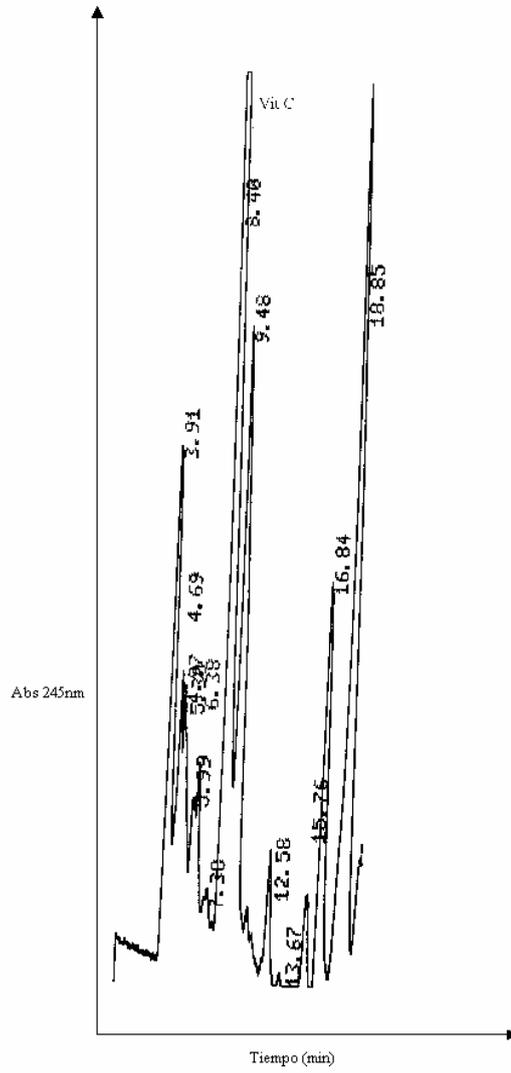


Figura 3.8. -Cromatograma de vitamina C de una muestra obtenido con el método HPLC-UV.

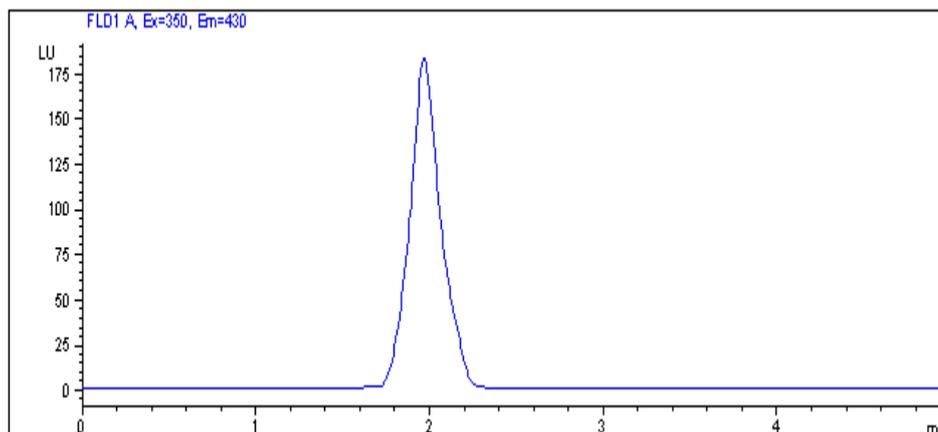


Figura 3.9. - Cromatograma de vitamina C de una muestra obtenido por el método HPLC-FLUORESCENCIA.

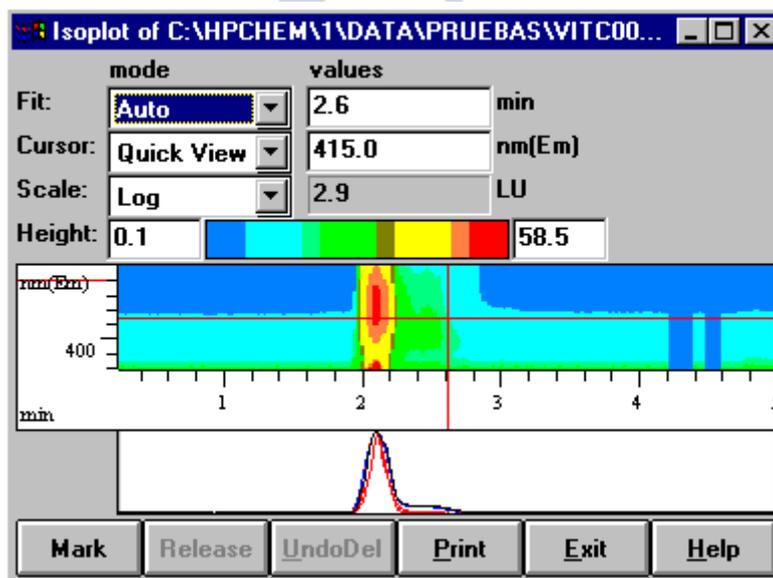


Figura 3.10. - Espectro de emisión de la vitamina C en 2D obtenido con el “Fluorescence array Detector”.

3.4. - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

Abdel-Kader y Z.M.(1992). "Comparison of AOAC and high performance liquid chromatographic methods for thiamin determination in foods". *Food Chemistry* 43: 393-397.

Albala-Hurtado, S; Veciana-Nogues, M.T. y Izquierdo-Pulido, M.(1997). "Determination of water-soluble vitamins in infant milk by high-performance liquid chromatography". *J.Chromatogr.A.* 778: 247-253.

Albretch, J.A. y Schafer, H.W. (1990). "Comparison of two methods of ascorbic acid determination in vegetables". *J Liq Chromatogr.* 13(13):2633-2641.

Al-Khalifa, A.S. y Dawood,A.A.(1993). "Effects of cooking methods on thiamin and riboflavin contents of chicken meat". *Food Chemistry.* 48: 69-74.

American Chemical Society (ACS) (1980). Subcommittee on environmental analytical chemistry. "Guidelines for data acquisition and data quality evaluation in environmental chemistry". *Anal. Chem.* 52:2242-2280.

Arella, F; Lahely, S; Bourguignon, J.B. y Hasselmann, C.(1996). "Liquid chromatographic determination of vitamins B₁ and B₂ in foods.A collaborative study". *Food Chemistry.* 56 (1): 81-86.

Augustin, J.(1984). " Simultaneous determination of thiamine and riboflavin in foods by liquid chromatography". *J.Assoc.Off.Anal.Chem,* 67 (5):1012-1015.

Belitz, H.D. y Grosch, W. (1988). “Química de los alimentos”. Ed. Acribia, Zaragoza 2ª edn. Cap.6.

Block, G.& Menkes, M. (1989). “Nutrition and Cancer Prevention- Investigating the Role of Micronutrients.” Ed. Moon & M.S. Micozzi. Marcel Dekker, Inc; New York.

Capellmann, M. y Bolt, H.M. (1992). “Simultaneous determination of ascorbic acid and dehydroascorbic acid by HPLC with postcolumn derivatization and fluorometric detection”. *Fresenius J. Anal Chem.* 342:462-466.

Carr, R.S; Bally, M.B.; Thomas, P.; y Neff, J.M. (1983). “Comparison of methods for determination of ascorbic acid in animal tissues”. *Anal. Chem.* 55(8):1229-1232.

Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos (1993). “Nutrición y Dietética. Aspectos Sanitarios”. Ed. Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, Madrid, 1ª edn. Cap 4.

Dabrowski, K. y Hinterleitner, S. (1989). “Applications of a simultaneous assay of ascorbic acid, dehydroascorbic acid and ascorbic sulphate in biological materials.” *Analyst* 114:83-87.

Dabrowski, K. y Blom, J. H. (1994). “Ascorbic acid deposition in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs and survival of embryos”. *Comp. Biochem. Physiol.* 108:129-135.

Duodu, K.G; Minnaar, A. y Taylor, J.R.N.(1999). “ Effect of cooking and irradiation on the labile vitamins and antinutrient content of a traditional African sorghumporridge and spinach relish”. *Food Chemistry* .66 (1):21-27.

Esteve, M.J; Farre, R; Frigola, A; López, J.C; Romera, J.M; Ramirez, M. y Gil, A.(1995). “Comparison of voltametric and high performance liquid chromatographic methods for ascorbic acid determination in infant formulas”. *Food Chemistry*. 52(1):99-102.

Fellman, J.K; Artz, W.E; Tassinari, P.D; Cole,C.L. y Augustin, J.(1982) “Simultaneous determination of thiamin and riboflavin in selected foods by high-performance liquid chromatography”. *Journal of Food Science*. 47:2048-2051.

Fennema, O. (1993). “Química de los alimentos”. Ed. Acribia, Zaragoza, 2^a edn. Cap 7.

Fernado, S.M and Murphy, P.A.(1990). “HPLC determination of thiamin and riboflavin in soybeans and tofu”. *J.Agric.Food.Chem.* 38:163-167.

Hasselmann, C; Franck, P; Grimm, P; Diop, P. y Soules, C.(1989). “High performance liquid chromatographic analysis of thiamin and riboflavin in dietetic foods”. *J.Micronutr.Anal.* 5: 269-279.

Hou, W.Y. y Wang, E.K.(1990). “Liquid chromatography with series dual-electrode electrochemical detection for riboflavin”. *Analyst*. 115 (2): 139-141.

Ito, T; Murata, H; Yasui, Y; Matsui, M; Sakai, T. y Yamauchi, K.J.(1995). “Simultaneous determination of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in fish tissues by high –performance-liquid chromatography”. *J. Chromatogr.B* 667:355-357.

Kall, M.A. y Andersen, C.J. (1999). “Improved method for simultaneous determination of ascorbic acid and dehydroascorbic acid, isoascorbic acid and dehydroisoascorbic acid in food and biological samples”. *J. Chromatogr.B* 730:101-111.

Kim, J; Wen-Xian Du; Otwell, W.S; Marshall, M.R. y Cheng-i-Wei. (1998). “Nutrients in salmon and red grouper filets as affected by chlorine dioxide (ClO₂) treatment”. *Journal of Food Science*. 63 (4): 629-633.

López y López-Leyton, T.J; Lage-Yusty, M.A. y Álvarez-Piñero, M.E. (1998). “Constant-wavelength synchronous spectrofluorimetry for determination of riboflavin in anchovies”. *Fresenius J Anal Chem*. 362: 341-343.

Mahan, L.K. y escott-Stump, S (2001). “Nutrición y dietoterapia de Krause”. Ed. McGraw-Hill Interamericana. 10ªedn. Cap.4.

Martínez, J.A. (1998). “Fundamentos teórico-prácticos de Nutrición y dietética” Ed. Mc Graw-Hill Interamericana de España, S.A.U. Cap.3.

Merchie, G; Lavens, P; Dhert, Ph; Dehasque, M; Nelis, H; De Leenher, A. y Sorgeloos, P. (1995). “Variation of ascorbic acid content in different live food organisms”. *Aquaculture*.134:325-337.

Miller, J. M; Brindle, I. D; Caster, S.R y So, K.H. (1980). “ Potassium fluoride-assisted derivatization of carboxylic acids to phenacyl esters for determination by high performance liquid chromatography” *Anal.Chem.* 52:2430-2432.

Mori, K; Kidawara, M; Iseki, M; Umegaki, C y Kishi, T. (1998). “A simple fluorimetric determination of vitamin C.” *Chem.Pharm.Bul.* 46(9):1474-1476.

National Research Council. (1991). “Raciones dietéticas recomendadas”. Ed. Consulta, Barcelona. Spain. Cap. 8.

Nelis, H.J; De leenheer, A.P; Merchie, G; Lavens, P.y Sorgeloos. (1997). “Liquid chromatographic determination of vitamin C in aquatic organisms”. *J Chromatographic Science.* 35:337-341.

Papadoyannis, I.N; Tsioni, G.K. y Samanidou, V.F.(1997). “Simultaneous determination of nine water and fat soluble vitamins after SPE separation and RP-HPLC analysis in pharmaceutical preparations and biological fluids”. *J.Liq.Chrom.& Rel.Techol.* 20 (19): 3203-3231.

Perisic, J.N. y Vujicic, B. (1997). “Analysis of some food components by thin-layer chromatography on unconventional layers”. *Journal of Planar Chromatography-ModernTLC.* 10 (6): 447-452.

Robinson, D.S.(1987). “Food biochemistry and nutritional value”. Ed Longman Scientific & Technical, U.K.Cap.8.

Russell, L.F. y Vanderslice, J.T.(1992). “Non-degradative extraction and simultaneous quantitation of riboflavin, flavin mononucleotide, and flavin adenine dinucleotide in foods by HPLC”. *Food Chemistry*. 43:151-162.

Sánchez-Mata, M.C; Cámara-Hurtado, M; Díez-Marqués, C. y Torija-Isasa, M.E.(2000). “Comparison of high –performance liquid chromatography and spectrofluorimetry for Vitamin C analysis of green beans (*Phaseolus vulgaris* L.)”. *Eur Food Res Technol*. 210:220-225.

Sarkar, P.K; Morrison, E; Tinggi, U; Somerset, S.M. y Craven, G.S.(1998). “B-group vitamin and mineral contents of soybeans during kinema production”. *J.Sci.Food.Agric*. 78: 498-502.

Shimada, K; Nakagawa, S; Hotta, K; Shibata, K. y Yagi, T.(1993). “Effect of processing and storage on the fate of vitamins B₁, B₂ , and B₆ and nicotinamide of sea urchin gonads”. *J.Agric. Food.Chem*. 41 (7):1021-1025.

Shirsat, S.G. y Thomas, P. (1998). “Effect on irradiation and cooking methods on ascorbic acid levels of four potato cultivars”. *Journal of Food science and Technology*. 35(6): 509-514.

Sims, A. y Shoemaker, D.(1993). “Simultaneous liquid chromatographic determination of thiamine and riboflavin in selected foods”. *Journal of AOAC International*. 76 (5): 1156-1160.

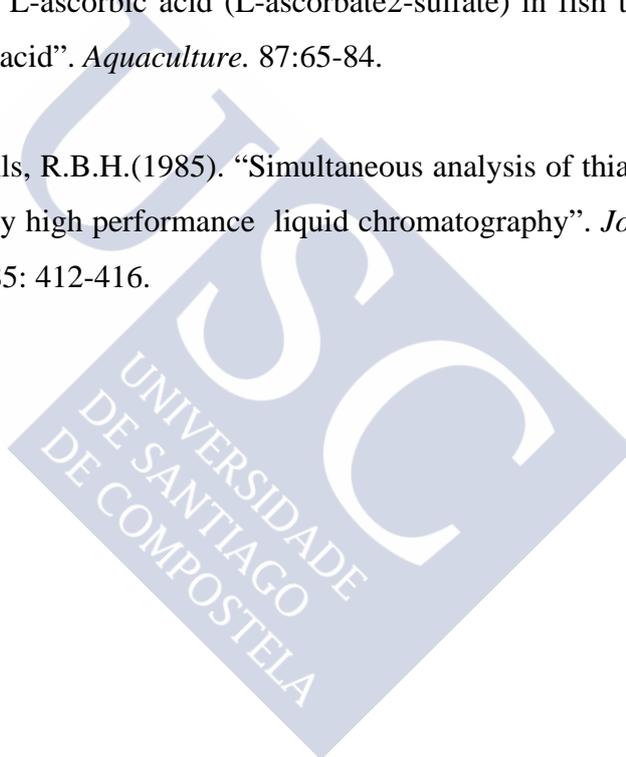
Tapadia, S.B; Arya, A.B. y Devi, P.R.(1995). “Vitamin C contents of procesed vegetables”. *Journal of Food science and Technology*.32(6):513-515.

Vanderslice, J.T. y Higgs, D.J. (1984). "HPLC analysis with fluorimetric detection of vitamin C (ascorbic acid) in food samples". *J.Chromatogr. Sci.* 22 (11): 485-498.

Vázquez-Oderiz, M.L; Vázquez-Blanco, M.E; López-Hernández, J; Simal-Lozano, J. y Romero-Rodríguez. (1994). "Simultaneous determination of organic acids and vitamin C in green beans by liquid chromatography". *J. AOAC International.* 77(4):1056-1059.

Wang, X.Y. y Seib, P.A. (1990). "Liquid chromatographic determination of a combined form of L-ascorbic acid (L-ascorbate2-sulfate) in fish tissue by release of l-ascorbic acid". *Aquaculture.* 87:65-84.

Wimalasiri, P. y Wills, R.B.H.(1985). "Simultaneous analysis of thiamin and riboflavin in foods by high performance liquid chromatography". *Journal of Chromatography.* 385: 412-416.





4. - CAROTENOIDES Y VITAMINAS LIPOSOLUBLES

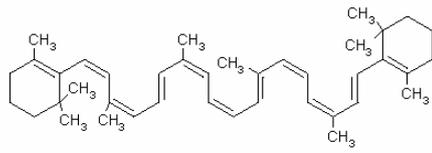
4.1. - INTRODUCCIÓN.

El color es un carácter organoléptico de suma importancia en los alimentos, pudiéndose usar como criterio de calidad ya que los pigmentos responsables pueden verse muy modificados con distintas operaciones de procesado (Chen y *col*; 1995).

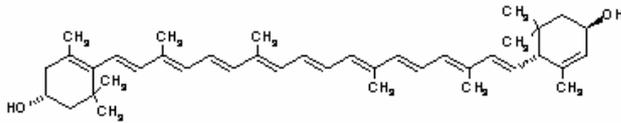
La calidad de los alimentos además de en sus características microbiológicas se basa en general en el color, aroma, textura y valor nutritivo. Dependiendo del alimento en particular, estos factores pesan en grado diverso al evaluar la calidad global. Sin embargo, es uno de los atributos más importantes en la calidad sensorial del alimento; esto se debe, con independencia de su valor nutritivo aroma o textura a que es poco probable que se consuma un alimento a menos que tenga el color correcto.

La aceptabilidad de un alimento cualquiera se ve influenciada por muchos factores, culturales, geográficos y sociales de la población. Naturalmente, el color así como otros hábitos alimentarios puede ser considerado como un tipo de antropología culinaria característica de una región específica. Sin embargo con independencia de las características o hábitos de una zona determinada ciertos grupos de alimentos son solamente aceptables si están comprendidos dentro de una cierta escala de color. Además, la aceptación se ve forzada por su valor económico puesto que en muchos casos el valor de las materias primas se juzga por su color.

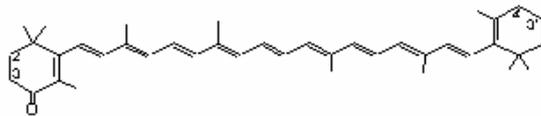
Los carotenoides son un grupo de compuestos principalmente liposolubles, responsables de muchos de los colores amarillo y rojo de los productos vegetales y animales.



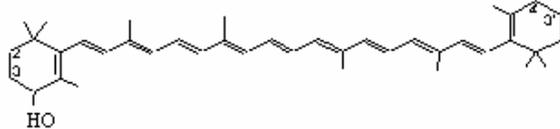
All-trans-β-Caroteno.



All-trans- Luteina.



β-Echinenona.



β-Isocryptoxantina.

Figura 4.1. – Estructura de los carotenoides identificados en el erizo de mar.

Los carotenoides constituyen una clase de hidrocarburos denominados carotenos y sus derivados oxigenados, las xantofilas. Están formados por ocho unidades isoprenoide ligadas de tal modo que la disposición de las unidades isoprenoides se invierte dentro de la molécula.

La asociación de carotenoides con proteínas es de reciente investigación, y su conocimiento se ha desarrollado primeramente a partir del estudio de pigmentos de diversos invertebrados (Fennema, 1993).

No obstante la propiedad que más destaca por su importancia a nivel fisiológico y dietético en humanos y otros animales es que algunos presentan actividad de provitamina A, (Simpson, 1983). Por escisión en el centro de la molécula el β -caroteno da dos moléculas de vitamina A (Fennema, 1993).

La actividad vitamínica A se encuentra en una serie de hidrocarburos insaturados de 20 y 40 átomos de carbono ampliamente difundidos en los reinos vegetal y animal.

Además de ser precursores de vitaminas a algunos carotenoides se le atribuye una actividad antiúlcera, anticáncer, reguladores inmunológicos, etc (Olson, 1989).

La causa principal de la degradación de los carotenoides de los alimentos es la oxidación. La intensidad de la oxidación depende de si el pigmento se encuentra "*in vivo* o *in vitro*" y de las condiciones ambientales. En los tejidos vivos intactos, la estabilidad de los pigmentos probablemente es función de la permeabilidad celular y de la presencia de componentes protectores.

En los alimentos procesados el mecanismo de oxidación es complejo y depende de muchos factores. Los pigmentos se pueden autooxidar por reacción con el oxígeno atmosférico a velocidades que dependen de la luz, el calor y la presencia de pro-y antioxidantes.

La estructura de la vitamina A puede presentarse como alcohol libre, como éster de ácidos grasos, como aldehído y como ácido.

En los animales, el hígado es el órgano más rico en vitamina A en el que se almacena generalmente como alcohol libre o alguna forma esterificada.

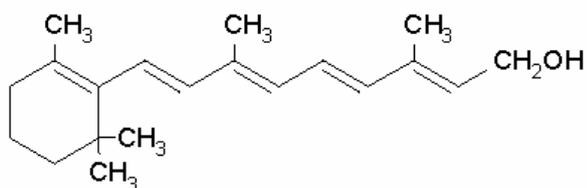


Figura 4.2. - Estructura de All-trans -retinol.

La vitamina E se encuentra en la naturaleza en una serie de tocoferoles y tocotrienoles. Entre ellos el más activo es el α -tocoferol. Ocho son los tocoferoles que se sabe existen en la naturaleza. Por ello, no ha sido posible desarrollar un método colorimétrico simple para el análisis de los alimentos.

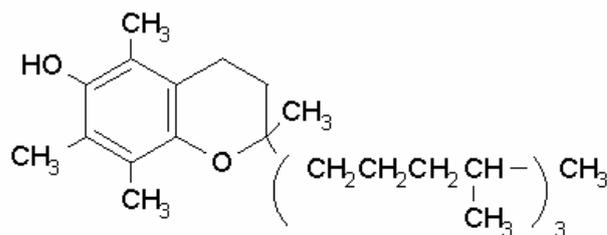


Figura 4.3. – Estructura de α -Tocoferol.

El procedimiento analítico implica una extracción, la saponificación del extracto y una cromatografía de la fracción insaponificable en capa fina (TLC) o gas-líquido (GLC). Más recientemente se ha desarrollado una nueva metodología basada en cromatografía HPLC, bien con detectores UV-Vis (Spencer y Purdy, 1997; Göbel y *col*; 1997) o de fluorescencia (Abidi y Mounts, 1994; Moriyama y *col*; 1998).

La vitamina E está ampliamente difundida en los diversos grupos de alimentos: semillas, aceites de semillas, aceites vegetales, granos de cereales, frutas, hortalizas y productos de origen animal.

El margen estimado de la ingesta diaria está comprendido entre 8 y 10 mg/día, para mujeres y hombres respectivamente, si bien en el caso de las mujeres se recomienda un aumento a 10 mg/día durante el embarazo (National Research Council, 1991).

La pérdida de vitamina E puede producirse por vía mecánica o por procesos oxidativos. Las pérdidas por oxidación acompañan habitualmente a la oxidación lipídica y puede deberse al uso de sustancias químicas en el procesado de los alimentos como peróxido de hidrógeno.

Recientemente, ha despertado un gran interés la utilización de ácido ascórbico y α -tocoferol como agentes bloqueantes para la prevención de la formación de nitrosaminas a partir de los nitritos y aminos. En este contexto el α -tocoferol reacciona con el nitrito cuando el pH es inferior a 5, formando sustancias que son idénticas a las originales por su oxidación en presencia de aire (Fennema, 1993).

4.2- PARTE EXPERIMENTAL.

4.2.1. -Reactivos.

- Patrones de carotenoides:

- All-trans- β -caroteno. SIGMA Art. C-9750. CAS 7235-40-7.
- All-trans Luteína. SIGMA Art.X-6250. CAS 127-40-2.
- β -Echinenona. HOFFMANN-LA ROCHE. CAS 432-68-8.
- β -Isocryptoxantina. HOFFMANN-LA ROCHE. CAS 472-62-8.

- Patrones de vitaminas:

- α -Tocoferol. SIGMA Art. T-3251. CAS 10191-41-0.
- All-trans- retinol. SIGMA Art. R-7632. CAS 68-26-8.

-Reactivos de grado para el análisis:

- Carbonato cálcico. MERCK Art.2066.
- Sulfato sódico anhidro. PANREAC Art.13176.

-Solventes de grado para HPLC:

- Metanol. SCHARLAU Art.Me309.
- Hexano. BAKER Art. 9262.
- Acetonitrilo. BAKER Art. 9017.
- Diclorometano. PROLABO Art 23 351326.

-Solventes de grado para el análisis:

- Acetona. NORMASOLV Art Nv 010.
- Éter de petróleo. PROLABO Art 23 837360.

4.2.2. - Material y aparatos.

a) Determinación de carotenoides:

- Cromatógrafo de líquidos Spectra-Physics, equipado con una bomba SP8800, válvula Rheodyne y bucle de inyección de 20 μ L.
- Detector UV-Vis Spectra Focus Forward Optical Scanning.
- Columna Spherisorb ODS de 250x 4.6mm y tamaño de partícula 25 μ
- Software PC1000 versión 3.0.
- Ordenador 386 IBM con 4MB de memoria RAM, con el sistema operativo "Operating System/2 versión 1.2.

b) Determinación de vitaminas liposolubles:

- Cromatógrafo de líquidos Hewlett Packard equipado con una bomba cuaternaria HP1100, válvula Rheodyne y bucle de inyección de 20 μ L.
- Detector Fluorescence array Detector HP1100
- Columna Kromasil 100 C18 de 25x0.4cm y tamaño de partícula 5 μ .
- Software HPCHEM para cromatografía líquida Rev.A.06.01 [403].
- Ordenador Hewlett-Packard HP vectra PC con 64MB de memoria RAM y microsoft Windows NT versión 4.0.

4.2.3. - Extracción de la muestra.

a) Carotenoides.

A 5 g de muestra se le añade 1 g de carbonato cálcico, se desintegra el tejido añadiendo arena de mar lavada y 20 g de sulfato sódico anhidro. A continuación se añaden pequeñas porciones de una mezcla de

acetona: éter de petróleo (1:1) filtrando de cada vez a vacío hasta que no quede color en el residuo, se juntan todos los filtrados llevándolos a un volumen total de 100 mL. Del extracto resultante se toma una alícuota de 10 mL y se evapora a sequedad bajo corriente de nitrógeno en un baño a 37 °C hasta obtener un residuo seco que se redissuelve en 2 mL de hexano, se filtra a través de un filtro Millipore de 0.22 µm para eliminar las partículas no solubles y se inyecta en el cromatógrafo.

b) Vitaminas liposolubles.

A 10g de muestra homogenizada se le añaden 100 mL de potasa etanólica 1M y se pone a reflujo durante 30 min. A continuación y una vez que haya enfriado se lleva a una ampolla de extracción y se extrae con hexano dos veces primero con 50 mL y después con 25 mL, se juntan ambas capas y se lleva a 100 mL. Se toma una alícuota de 10 mL y se evapora bajo corriente de nitrógeno a sequedad, el residuo se redissuelve en 2 mL, se filtra a través de un filtro Millipore de 0.22 µm para eliminar las partículas no solubles y se inyecta en el cromatógrafo.

4.2.4. -Preparación de los patrones.

Se prepara una solución madre con los carotenoides en acetona y otra solución con la vitamina E en metanol:acetonitrilo (1:1). De aquí se toman las porciones necesarias para establecer una escala de tal forma que las concentraciones de los carotenoides y de la vitamina E en la muestra queden en el rango de la escala establecida. La acetona se evapora bajo corriente de nitrógeno y se redissuelven las porciones en hexano, para luego ser inyectadas en el cromatógrafo.

4.2.5. - Condiciones de trabajo.

Para el análisis de carotenoides se ha aplicado el método utilizado por López-Hernández y *col.* 1993.

El sistema de elución utilizado para llevar a cabo la separación analítica se compone de 3 eluyentes: A= Metanol, B=Acetonitrilo y C=Diclorometano/Hexano 1:1. El gradiente de elución se muestra en la Tabla 4.I.

La separación de los compuestos se logra en un tiempo de 23 min. La absorción visible de los compuestos se mide a una longitud de onda de 450 nm seleccionada en función de los máximos de absorbancia de los espectros registrados de cada componente.

En cuanto a las vitaminas liposolubles, la fase móvil empleada consta de una mezcla de metanol:acetonitrilo (50:50) que se mantiene constante durante los 25 minutos que dura el análisis. El flujo es constante 1mL/min.

Para conseguir la separación del retinol y el α -tocoferol se emplea un “fluorescence array detector” seleccionando las longitudes de onda óptimas para cada compuesto: λ_{exc} 370 nm y λ_{em} 475 nm para el retinol y λ_{exc} 297 nm y λ_{em} 327 nm para el α -tocoferol. El cambio de longitudes de onda se efectúa a los 9 minutos.

4.2.6. - Identificación y cuantificación.

La identificación está basada en la comparación de los tiempos de retención y de los espectros visibles registrados con el sistema Spectra Focus con los de los patrones correspondientes para los carotenoides y con el espectro de fluorescencia de emisión y excitación para el α -tocoferol y el retinol.

Para la cuantificación se establece una recta de calibrado, de cuatro puntos, en función de la relación de las áreas de los picos con las concentraciones de

los correspondientes patrones. En la Tabla 4.II se muestran las ecuaciones de las rectas correspondientes a cada componente.

Tabla 4.I. - Gradiente empleado para la separación de los carotenoides.

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	%A	%B	%C
0	0.8	15	75	10
9.0	0.8	15	75	10
16.0	0.8	15	40	45
24.0	0.8	15	40	45
25.0	2.0	15	75	10
45.0	2.0	15	75	10

Tabla 4.II.- Rectas de calibrado ($y=a+bx$) de los compuestos estudiados. y =concentración ($\mu\text{g/mL}$), x =absorbancia o emisión leída.

Compuesto	a	b	r
All-trans-Luteína	-230.05	1621917	0.9999
β -Isocryptoxantina	5433.90	979522	0.9995
β -Echinenona	20010	2068132	0.9999
All-trans- β -caroteno	634.30	28734	0.9999
α -Tocoferol	13.49	43.36	0.9996
All-trans-Retinol	1.33	2.09	0.9991

4.3. - RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Tanto para las vitaminas liposolubles como para los carotenoides se han ensayado distintos métodos de extracción, los que incluyen una saponificación previa a la extracción de la muestra (Rey y col; 1996; Huo y col; 1997; López-Hernández y col; 1999) y los que extraen directamente con solventes (López-Hernández y col; 1993 Rey y col; 1996).

Comprobándose que: en el caso de los carotenoides, cuando se aplicaba el método que incluía una saponificación con potasa alcohólica el proceso de extracción no era completo por eso se optó por extraer directamente con solventes. Por el contrario en el caso de las vitaminas liposolubles el método que extraía directamente con tampón fosfato 0.054M pH= 7 (HCl) no daba lugar a una extracción completa, por ello se eligió el método que incluía una saponificación con potasa alcohólica 1M y como solvente de extracción hexano.

Para determinar las longitudes de onda óptimas de los diferentes carotenoides se hizo un scan con los patrones y se encontró que todos los compuestos presentaban el máximo de absorbancia a 450 nm por lo que se eligió como longitud de onda de trabajo y lo mismo para determinar las longitudes de onda óptimas de excitación y emisión para el retinol y el α -tocoferol.

Las figuras 4.4, 4.5 y 4.6 muestran los cromatogramas de carotenoides de una muestra y de vitaminas liposolubles del patrón y una muestra respectivamente.

Los límites de detección (definidos como la concentración más baja, cuya señal es tres veces la señal ruido) determinados según las normas de ACS (1980) fueron: 0.096 µg/mL para la luteína, 0.128 µg/mL para la β-isocryptoxantina, 0.016 µg/mL para la β-echinenona, 0.104 µg/mL para el β-caroteno, 1.125 µg/mL para el α-tocoferol y 1.350 µg/mL para el retinol.

Los valores de la precisión de la medida y del método, determinados como la desviación estándar relativa de una misma alicuota inyectada seis veces, y la desviación estándar relativa para ocho determinaciones, de ocho extractos (cada uno preparado separadamente a partir de la misma muestra homogenizada) respectivamente se presentan en la Tabla 4.III.

Para los ensayos de recuperación, concentraciones conocidas de soluciones de patrones se añaden a las muestras. Los resultados se muestran en la Tabla 4.III.

Tabla 4.III. -Precisión de la medida, del método y recuperación de los compuestos estudiados.

Compuestos	Precisión medida (RSD%)	Precisión método (RSD%)	%Recuperación
All-trans-Luteína	0.35	0.41	98.47
β-Isocryptoxantina	0.92	2.00	93.45
β-Echinenona	0.73	2.32	95.83
All-trans-β-caroteno	2.59	6.72	96.92
α-Tocoferol	1.30	2.58	94.82

La Tabla 4.IV muestra el contenido en carotenoides y α -tocoferol expresado en mg/100g de materia seca de muestras frescas y esterilizadas de erizo de mar, *Paracentrotus lividus*.

El carotenoide predominante en ambos tipos de muestra es la β -echinenona, al igual que ocurre en otras especies de erizo de mar (Tsushima y col; 1995).

El contenido de todos los carotenoides excepto la β -echinenona es sobre un 20-30% más bajo en muestras enlatadas que en muestras frescas. (Tabla 4.IV).

El aumento de β -echinenona en muestras enlatadas puede ser debido a que a menudo dicho carotenoide se une a las proteínas formando unos complejos que se llaman carotenoproteínas (Zagalsky, 1985). Estos compuestos se encuentran normalmente en el exoesqueleto, así como en huevos y ovarios (Mínguez-Mosquera, 1997). Procesos tales como el calentamiento como ocurre durante la esterilización o tratamiento con solventes hidrosolubles, tales como el alcohol o la acetona parecen favorecer la liberación de los carotenoides a partir de estos compuestos (Goodwin y col; 1980).

Otra posible explicación a la que se puede atribuir el aumento de β -echinenona en las muestras esterilizadas es que la degradación de carotenoides se acelere por los radicales libres que se forman en la oxidación lipídica, especial interés tiene el fenómeno de co-oxidación por determinadas lipooxigenasas (Belitz y Grosch, 1998).

Una tercera posible explicación es que las altas temperaturas alcanzadas en el autoclave durante el proceso de esterilización favorezcan la

bioconversión de β -caroteno en β -echinenona vía β -isocryptoxantina que en erizos de mar ocurre en la víscera (pared intestinal) y el resultado es que la β -echinenona se incorpora a las gónadas (Tsushima y *col*; 1993).

Aunque no se ha detectado retinol en las muestras estudiadas sí que se han identificado y cuantificado tres carotenoides con actividad vitamina A; β -isocryptoxantina, β -echinenona y β -caroteno. Teniendo en cuenta que 1 μ g de retinol equivale a 6 μ g de β -caroteno y que 1 μ g de retinol equivale a 12 μ g de otros carotenoides (National Research Council, 1991), el contenido en retinol de las muestras se sitúa entorno a 1.2-1.4 mg/100g de materia seca.

A pesar de no haber encontrado retinol en las muestras este método permite efectuar una determinación conjunta de ambas vitaminas en una sola inyección modificando las longitudes de onda de emisión y excitación de cada compuesto.

Se ha observado que el contenido en vitamina E disminuía aproximadamente en un 29% en muestras enlatadas respecto a muestras frescas. En los alimentos procesados, las pérdidas de vitamina E se deben sobre todo a su oxidación por oxígeno molecular o a su reacción con los peróxidos (Robinson, 1991).

Tabla 4.IV. - Contenido en carotenoides y vitamina E en muestras frescas y enlatadas de gónadas de erizo de mar (mg/100g de materia seca). Los valores mostrados son promedios (\pm SD) para ocho muestras diferentes.

Compuesto	Muestras Frescas	Muestras Enlatadas
All-trans-Luteína	3.44 \pm 0.18	2.58 \pm 0.28
β -Isocriptoxantina	1.89 \pm 0.17	1.33 \pm 0.09
β -Echinenona	11.35 \pm 0.82	15.08 \pm 3.41
All-trans- β -caroteno	0.79 \pm 0.08	0.61 \pm 0.06
α -Tocoferol	7.86 \pm 1.20	5.67 \pm 0.36



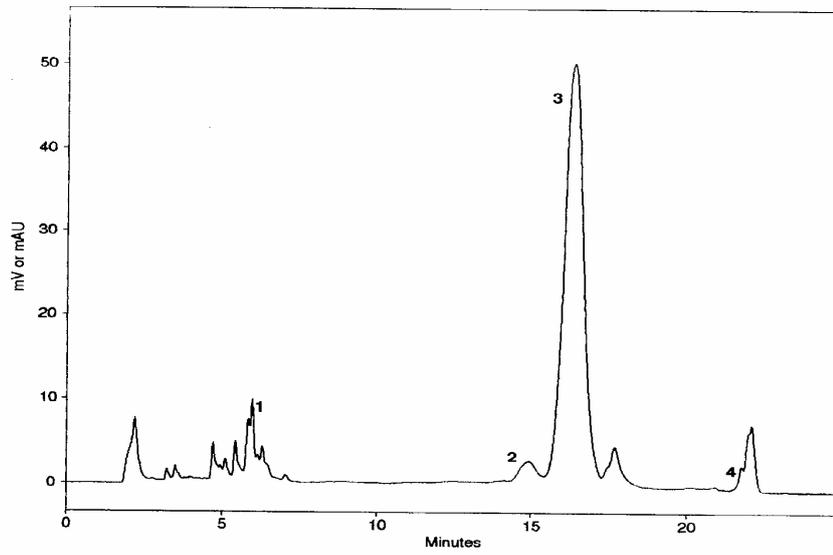


Figura 4.4. - Cromatograma de carotenoides de una muestra de erizo de mar.
(1) All-trans-Luteina, (2) β -Isocryptoxantina, (3) β -Echinenona, (4) All-trans- β -Caroteno.

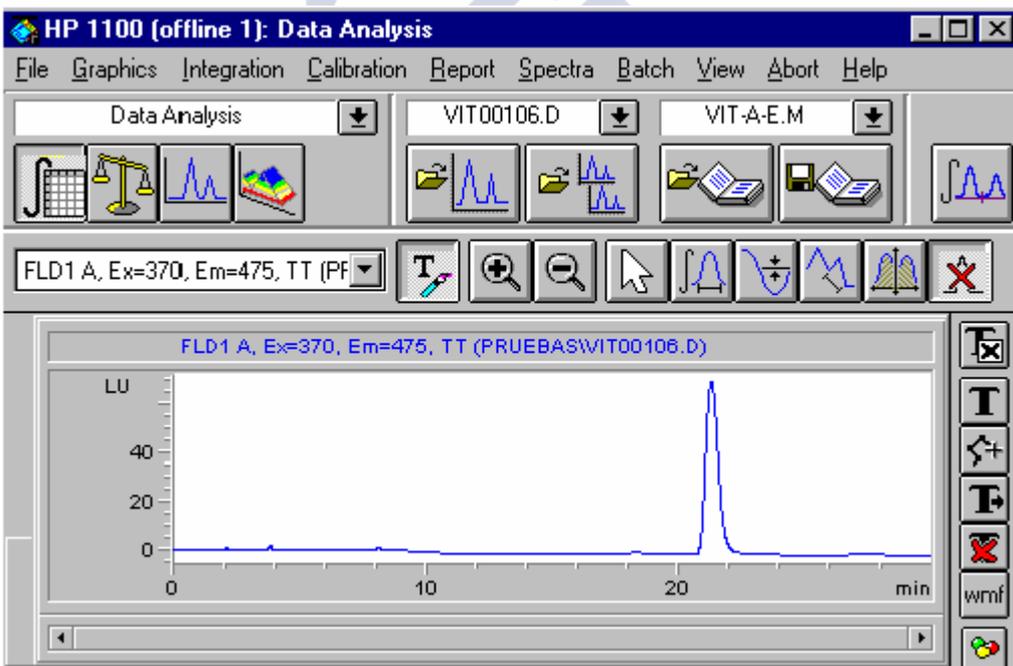
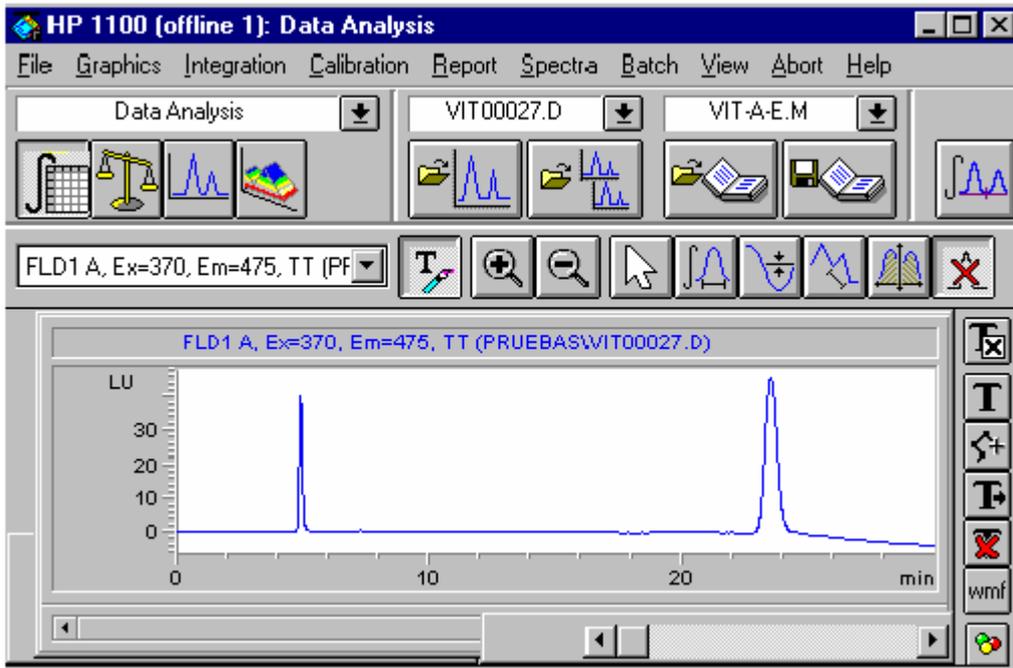


Figura 4.5. - Cromatogramas de vitaminas liposolubles de un patrón y una muestra.

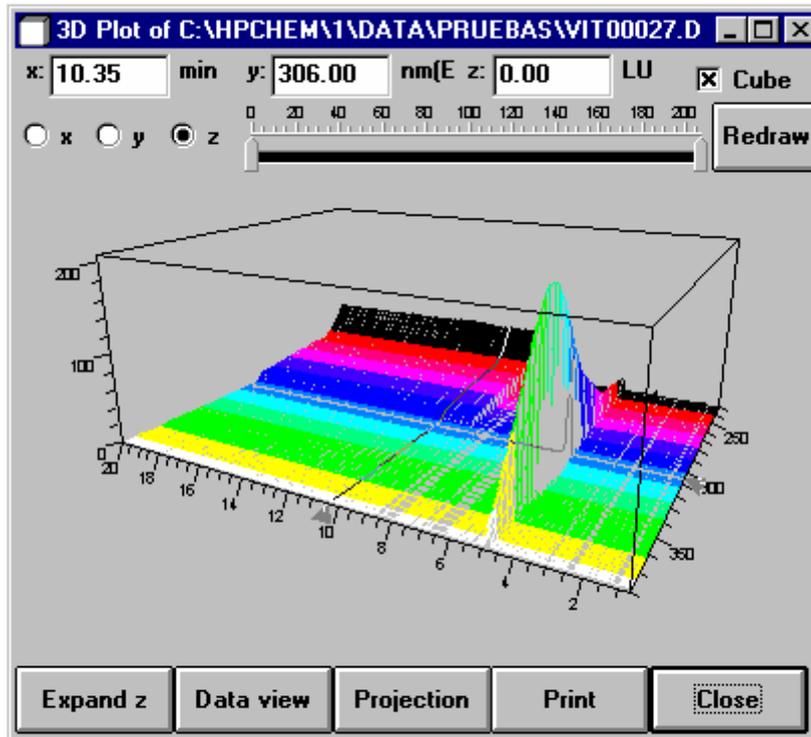


Figura 4.6. - Espectro de las vitaminas A y E en 3D obtenido con el Fluorescence Array Detector.

4.4. -REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

Abidi, S.L. y Mounts, T.L. (1994). “ Separations of tocopherols and methylated tocols on cyclodextrin-bonded silica”. *J. Chromatogr A.* 670:67-75.

American Chemical Society (ACS) (1980). Subcommittee on environmental analytical chemistry. “Guidelines for data acquisition and data quality evaluation in environmental chemistry”. *Anal. Chem.* 52:2242-2280.

Belitz, H.D. y Grosch, W. (1988). “Química de los alimentos”. Ed. Acribia, Zaragoza 2ª edn. Cap 3.

Chen, B.H; Peng, H.Y y Chen, H. E.(1995). “Changes of carotenoids, color and vitamin A contents during processing of carrot juice”. *J. Agric. Food. Chem.* 43:1912-1918.

Consejo Genral de Colegios Oficiales de Farmaceúticos(1993). “Nutrición y dietética. Aspectos sanitarios”. Consejo General de Colegios Oficiales de Farmaceúticos. Madrid. Spain. Cap 4.

Fénema, O. (1993). “Química de los alimentos”. Ed. Acribia, Zaragoza 2ª edn. Cap.8.

Göbel, Y; Schaffer, Ch. y Koletzko, B. (1997). “Simultaneous determination of low plasma concentrations of retinol and tocopherols in preterm infants by a high-performance liquid chromatographic micromethod”. *J. Chromatogr B.* 668:57-62.

Goodwin, T.W. (1980). "Modern methods of plant analysis". Ed. Springer, Berlin. Heidelberg. New York. Vol III. Cap. Carotenoids.

Hewavitharana, A.K; Van Brakel A.S. y Harnett, M.(1996). " Simultaneous liquid chromatographic determination of vitamins A E and β -carotene in common dairy foods". *Int. Dairy Journal*. 6:613-624.

Huo, J-Z; Nelis, H.J.; Lavens, P.; Sorgeloos, P. y De Leenheer, A. (1997). "Determination of E vitamers in microalgae using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection". *J. Chromatogr. A*. 782:63-68.

López-Hernández, J; Vázquez-Oderiz, L; Vazquez-Blanco, E; Romero-Rodriguez, A y Simal-Lozano, J.(1993). "HPLC determination of major pigments in the bean *Phaseolus vulgaris*". *J. Agric.Food. Chem*. 41:1613-1615.

López-Hernández, J; González-Castro, M.J. y Piñeiro-Sotelo, M.(1999) "Determination of sterols in sea urchin gonads by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection". *Journal of Chromatographic Science*. 37:2-4.

Mínguez Mosquera, M.I. (1997). "Clorofilas y carotenoides en tecnología de alimentos". Publicaciones Universidad de Sevilla. Sevilla. Spain. Cap 2.

Moriyama, H; Yamasaki,H; Masumoto,S; Adachi, K; Katsura, N. y Onimaru, T.(1998). " Rapid determination of vitamins A and E in serum with surfactant as a diluent by column-switching high-performance liquid chromatography" . *J. Chromatogr A*. 798:125-130.

National Research Council. (1991). "Raciones dietéticas recomendadas". Ed. Consulta, Barcelona. Spain. Cap. 7.

Olson, J.A. (1989). "Biological actions of carotenoids" *J.Nutr.* 119: 94-95.

Pozo, R.G.; Saitua, E. S; Uncilla, I. y Montoya, J. A.(1990). " Simultaneous determination of fat-soluble vitamins in albacore (*Thunnus alalunga*)". *J. Food Sci.* 55:77-78.

Rey, A.; López, C; Soares, M.; y Isabel, B. (1996). " Determination of α -tocopherol in pork with high intramuscular fat content". *Grasas y Aceites* 47:331-334.

Robinson, D.S.(1991). "Bioquímica y valor nutritivo de los alimentos". Ed.Acribia, Zaragoza. Cap.8.

Simpson, K.L. (1983). "Relative value of carotenoids as precursors of vitamin A". *Proc.Nutr.Soc.* 42:7-17.

Spencer, B. J. y Purdy, W.C. (1997). "Comparison of the separation of fat soluble vitamins using β -cyclodextrins in high-performance liquid chromatography and micellar electrokinetic chromatography". *J. Chromatogr A.* 782:227-235.

Steghens, J.P.; Van Kappel, A.L; Ribili, E. y Collombel, C. (1997) "Simultaneous measurement of seven carotenoids, retinol and α -tocopherol in serum by high-performance liquid chromatography". *J. Chromatogr.B.* 694:71-81.

Tsushima, M; Kawakami, T. y Matsuno, T.(1993). “Metabolism of carotenoids in sea-urchin *Pseudocentrotus depressus*”. *Comp. Biochem. Physiol.* 106:737-741.

Tsushima, M; Byrne, M; Amemiya, S. y Matsuno, T.(1995). “Comparative biochemical studies of carotenoids in sea urchin- III. Relationship between developmental mode and carotenoids in the Australian echinoids *Heliocidaris erythrogramma* and *H. tuberculata* and a comparison with Japanese species”. *Comp. Biochem. Physiol.* 110:719-723.

Zagalsky, P.F.(1985). “ Invertebrate carotenoproteins”. *Methods Enzymol.* 111:216-247





5. – LÍPIDOS

5.1. - INTRODUCCIÓN.

Los lípidos consisten en un amplio grupo de compuestos, en general solubles en disolventes orgánicos y escasamente solubles en agua. Son los principales componentes del tejido adiposo y, junto con las proteínas y los carbohidratos constituyen el grueso de los componentes estructurales de todas las células vivientes.

Los lípidos, también denominados grasas, son una fuente concentrada de energía suministrando algo más de dos veces de calorías por gramo que las proteínas y los carbohidratos (9 frente a 4 Kcal/g). Por otra parte proporcionan una sensación de saciedad y contribuyen a la palatabilidad de los alimentos. También juegan un importante papel en la nutrición ya que aportan calorías y ácidos grasos esenciales y actúan como transportadores de vitaminas, pero durante décadas han sido centro de una gran controversia sobre problemas de toxicidad o sobre el origen de ciertas enfermedades (Fennema, 1993).

Además de impartir cualidades nutricionales los lípidos tienen importantes efectos sobre la estructura, textura y aroma de los alimentos (Hammond, 1989).

5.1.1. – Fosfolípidos.

Los fosfolípidos son derivados del ácido fosfatídico, un triglicérido modificado que contiene un grupo fosfato en la tercera posición. El ácido fosfatídico es esterificado a una molécula que contiene nitrógeno, colina, serina, inositol o etanolamina (Figura 5.1b). Los fosfolípidos suelen tener un ácido graso saturado y uno poliinsaturado (Mahan y Escott-Stump, 2001).

La función más importante de los fosfolípidos es la de ser un constituyente clave de las membranas biológicas, formando una bicapa con las colas hidrófobas enfrentadas hacia el interior de la membrana y las cabezas polares hacia el interior y exterior de la célula. Por tanto, se encuentran tanto en alimentos de origen animal como vegetal.

Otra función destacable desde el punto de vista biológico, y también desde el punto de vista comercial, es su carácter emulgente.

Normalmente los ácidos grasos poliinsaturados que se encuentran esterificando la molécula de glicerol de los fosfolípidos van a actuar como precursores en la síntesis de compuestos de gran actividad biológica como son las prostaglandinas, protociclinas, tromboxanos y leucotrienos.

Dentro de este grupo se encuentran también otras moléculas de importancia biológica como son las esfingomielinas, que contienen esfingosina, un aminoalcohol unido a la fosforilcolina (Figura 5.1a) (Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, 1993).

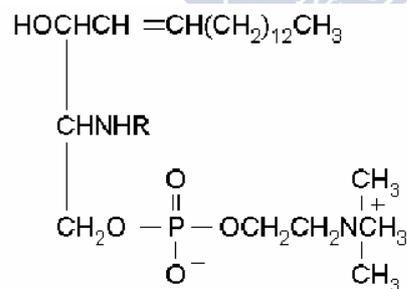


Figura 5.1.a. –Estructura de la esfingomielina.

FOSFOLÍPIDOS

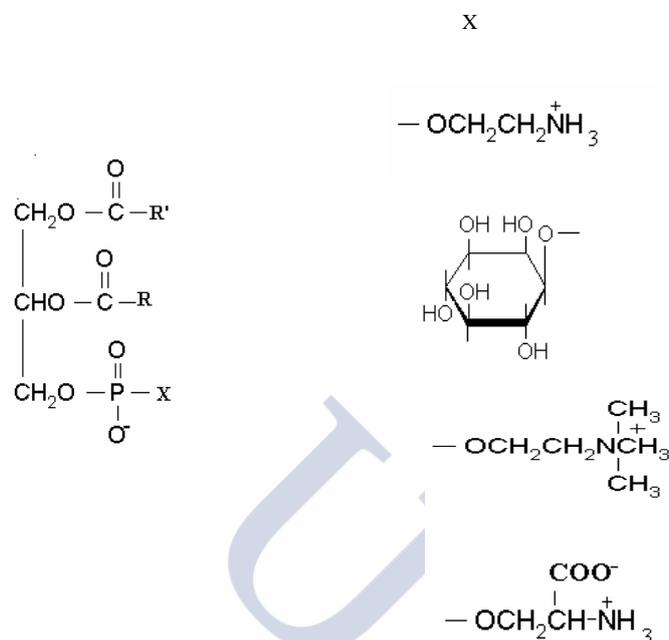


Figura 5.1.b. – Estructura de la fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, fosfatidilcolina y fosfatidilserina.

Las técnicas tradicionales para la separación de los diferentes lípidos incluyen cromatografía en capa fina, y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Para el análisis de fosfolípidos por HPLC normalmente se utiliza un detector ultravioleta, o de índice de refracción éste último sistema de detección presenta poca sensibilidad, la detección por ultravioleta es más sensible sin embargo el rango en el que absorben los fosfolípidos, 200-210 nm, hace difícil el uso de solventes cromatográficos ya que éstos no son transparentes en esta región. Últimamente, se ha utilizado el detector de

“light-scattering”, para la separación y cuantificación de los lípidos, sin embargo muchas veces estos métodos conllevan el uso de complejos gradientes (Christie, 1986; Bünger y Pison, 1995).

5.1.2. – Ácidos grasos.

Los ácidos grasos raras veces están libres en la naturaleza y casi siempre se encuentran unidos a otras moléculas por su grupo frontal hidrofílico de ácido carboxílico. Existen principalmente como cadenas de hidrocarburo no ramificadas principalmente con un número par de carbonos saturados variablemente con oxígeno. Los ácidos grasos se clasifican de acuerdo con el número de carbonos en la cadena, el número de enlaces dobles y la posición del primer enlace doble (Mahan y Escott-Stump, 2001).

Las propiedades que presentan los ácidos grasos van a depender tanto de su longitud como de su grado de insaturación (Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, 1993).

Los ácidos grasos insaturados son altamente sensibles a la oxidación por el oxígeno atmosférico. El grado de oxidación de los lípidos presentes en un alimento se correlaciona típicamente con la proporción de ácidos grasos insaturados (Belitz y Grosch, 1988).

En cuanto a las fuentes alimentarias de los ácidos grasos, los diferentes tipos se distribuyen de una forma específica en las distintas especies animales y vegetales que constituyen los alimentos que forman nuestra dieta. Así en los animales terrestres predominan las grasas ricas en ácidos grasos saturados, en las grasas lácteas, como la mantequilla, son característicos los

ácidos grasos de cadena corta, y en los animales acuáticos los ácidos grasos predominantes son los insaturados de cadena larga en animales de agua dulce y muy larga en animales marinos (Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, 1993). Últimamente se está prestando mucha atención al estudio de especies marinas ya que se considera que constiuyen las principales fuentes de ácidos grasos ω -3 en la nutrición humana (Ackman, 1989).

Además se cree que los ácidos grasos de la serie ω -3 están implicados en reducir la incidencia de enfermedades cardiovasculares (Kinsella, 1988) y se cree también que tienen efectos beneficiosos en la hipertensión, inflamación, arritmias, psoriasis y cáncer (Lee y col; 1985).

Los lípidos no son estrictamente necesarios como nutrientes a excepción de los ácidos grasos esenciales. Estos son ácidos grasos poliinsaturados que no pueden ser sintetizados por el organismo humano. Se han venido considerando ácidos grasos esenciales el linoleico, el linolénico y el araquidónico. El ácido linoleico tiene importantes funciones metabólicas entre las que destaca su intervención en la síntesis de prostaglandinas además a partir de él se forma el araquidónico de manera que este último no es esencial siempre que exista el linoleico. El ácido linolénico es imprescindible en la formación de estructuras celulares del sistema nervioso y también a partir del mismo pueden formarse los ácidos grasos ω -3 (Cervera y col; 1993).

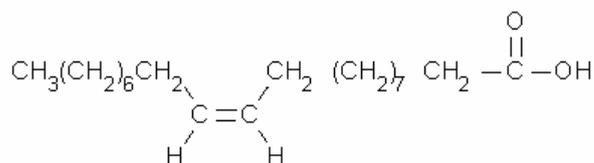
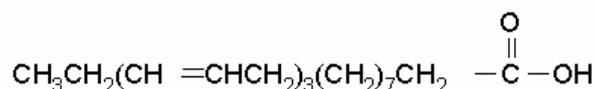
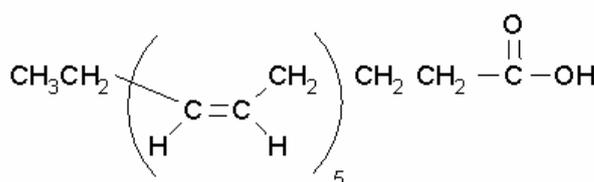
20:1 ω 920:3 ω 320:5 ω 3

Figura 5.2. -Estructura de los ácidos grasos insaturados mayoritarios en el erizo de mar.

Debido al importante papel que los ácidos grasos desempeñan en la dieta, se han desarrollado numerosos métodos para su determinación entre los que destacan los cromatográficos ya sea cromatografía en capa fina (Svetashev y Zhukova, 1985; Nakamura y *col*; 1996) cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Jasperse, 1988; Alaiz y *col*; 1989; Tsuzuki y *col*; 1991; Teng y Made-Gowda, 1993) y fundamentalmente cromatografía gaseosa (Sigurgisladdottir y Palmadottir, 1993; Andrade y *col*; 1995; Banerjee y *col*; 1997; Pendl y *col*; 1998; Kallio y *col*; 1998).

5.2. - PARTE EXPERIMENTAL.

5.2.1. - Reactivos.

- Patrones de fosfolípidos:
 - L- α -Fosfatidilinositol. SIGMA Art. P-0639.
 - DL- α -Fosfatidiletanolamina(dipalmitoil). SIGMA Art. P-3627. CAS 5681-36-7.
 - L- α -Fosfatidilcolina. SIGMA Art. P-7318. CAS 8002-43-5.
 - Esfingomielina. SIGMA Art. S-7004. CAS 85187-10-6.
 - L- α -Fosfatidil-L-serina. SIGMA Art. P-7769.

- Patrones de ácidos grasos:
 - Patrón de 37 ácidos grasos. Accu Standard Inc. Art. FAMQ-005.
 - Ácido nonadecanoico (metil éster). SIGMA Art. N-5377. CAS 1731-94-8.
 - Ácido 6,9,12,15-Octadecatetraenoico (metil éster). SIGMA Art. O-5130. CAS 2348-88-1.
 - Ácido cis-11-Octadecenoico (metil éster) (ácido vaccénico). SIGMA Art. V-1256. CAS 1937-63-9.

- Reactivos de grado para el análisis:
 - Carbonato potásico. PROBUS Art. 18436.
 - Sulfato sódico anhidro. PANREAC Art. 131716.

- Reactivos de grado para HPLC:
 - Cloroformo. MERCK Art. 1888.
 - Metanol. MERCK Art.1230.

- n-Hexano. MERCK Art. 1208.
- 2-Propanol. MERCK Art.1219.
- Acetonitrilo. MERCK Art.1648.

- Reactivos de grado para el análisis:

- Tolueno. NORMASOLV Art. Nv211.
- Ácido orto-Fosfórico 85%. MERCK Art. 1805.
- Ácido clorhídrico. PROLABO Art. 252290.

El agua utilizada para todas las soluciones se obtuvo a partir de un sistema de purificación del agua Mili-Q (Millipore).

5.2.2. - Material y aparatos.

a) Determinación de fosfolípidos:

- Cromatógrafo de líquidos Spectra-Physics, equipado con una bomba SP8800, válvula Rheodyne y bucle de inyección de 20 μ L
- Detector UV-Vis Spectra Focus Forward Optical Scanning.
- Columna Tracer Extrasil Si de 25x 0.4cm y tamaño de partícula de 5 μ m.
- Sistema de termostatización de columna Spectra-Physics SP8792.
- Software PC1000 versión 3.0
- Ordenador 386 IBM con 4 MB de memoria RAM, con sistema operativo "operating System/2" versión 1.2.

b) Determinación de ácidos grasos:

- Cromatógrafo de gases Fisons GC-8000, equipado con inyector split-splitless.
- Detector de ionización de llama (FID) Fisons EI-980.

- Columna capilar DB-Wax (60 m x 0.32 mm id x 0.25 μ m con una película de polietilenglicol) de J&W Scientific.
- Software Chrom-Card versión 1.18.
- Ordenador Dell 486X, con el sistema operativo MS-DOS versión 6.2.
- Gas portador: Helio.
- Centrífuga Ettich EBA 12
- “Vortex” Stuart Scientific SA6.

5.2.3. - Extracción de la muestra.

a) Fosfolípidos.

La extracción de los lípidos a partir de las gónadas de erizo se hace de acuerdo con el método de Bligh y Dyer, 1959.

Los extractos se evaporan a sequedad bajo corriente de nitrógeno, y el residuo se redisuelve en 1 mL de n-hexano:2-propanol (3:1), se filtra a través de un filtro Millipore de 0.22 μ m para eliminar las partículas no solubles y se inyecta en el cromatógrafo.

b) Ácidos grasos.

Las muestras se extraen según el método descrito por Ulberth y Henninger, 1992. Se pesan 0.2 g de muestra seca, estufa a vacío 60 °C 5 horas, en un tubo pyrex, se adicionan 2 mL de tolueno, 2 mL de ácido clorhídrico metanólico al 5% recién preparado y el metil éster del ácido nonadecanoico, que se utiliza como estándar interno. Después de mezclar el contenido con ayuda del vortex se pasa una corriente de nitrógeno, se cierran los tubos con tapones de rosca y se colocan en un baño de agua a 70 °C durante 2 horas. Después de que hayan enfriado las muestras se adicionan 5 mL de carbonato potásico al 6% y 2 mL de tolueno y se agita en el vortex.

La separación de las fases se consigue mediante una centrifugación a 1100 rpm 5 min. La fase orgánica se seca con sulfato sódico y a continuación se filtra con un filtro de tamaño de poro de 0.50 μm y se inyecta 1 μL en el cromatógrafo.

5.2.4. - Preparación de los patrones.

Se prepara una solución madre con los fosfolípidos en n-hexano: 2-propanol (3:1). De aquí se toman las porciones necesarias para establecer una escala de tal forma que las concentraciones de los fosfolípidos en la muestra queden en el rango de la escala establecida.

Para los ácidos grasos, se utiliza un patrón de Accu Standard Inc FAMQ-005 de concentraciones conocidas y patrones individuales de los ésteres metílicos de los ácidos 6,9,12,15-Octadecatetraenoico y vaccénico.

5.2.5. - Condiciones de trabajo.

a) Fosfolípidos:

- Fase móvil: Consta de una mezcla de acetonitrilo: metanol:ácido fosfórico (50:50:1.8).
- Flujo: 1.5 mL/min.
- Columna termostaticada a 28 $^{\circ}\text{C}$.
- Detección: 205 nm.

b) Ácidos grasos.

- Temperatura del inyector: 250 $^{\circ}\text{C}$.
- Temperatura del detector: 260 $^{\circ}\text{C}$.
- Temperatura de la columna programada de 110 a 230 $^{\circ}\text{C}$.
- Cantidad de muestra inyectada: 1 μL
- Presión en cabeza de columna: 15 psi.

- Flujo del gas portador: 1.35 mL/min.
- Velocidad lineal media: 22.76 cm/sg.
- Relación de split: 1:15.
- Programa de temperatura: La inyección se realiza con una temperatura de la columna de 110 °C, pasados 5 minutos desde la inyección comienza un gradiente de 5 °C/min hasta 230 °C manteniéndose a esta temperatura 10 minutos.

5.2.6. - Identificación y cuantificación.

En el caso de los fosfolípidos para la cuantificación se estableció una recta de calibrado de cuatro puntos, en función de la relación de las áreas de los picos con las concentraciones de los correspondientes patrones. Las ecuaciones se muestran en la Tabla 5.I.

La identificación de los ésters metílicos de los ácidos grasos se efectuó por comparación con los correspondientes patrones. Para la cuantificación se utilizó el éster metílico del ácido nonadecanoico (C: 19) como estándar interno.

Tabla 5.I. -Rectas de calibrado ($y=a+bx$) de los fosfolípidos.

Compuesto	a	b	r
L- α -Fosfatidilinositol	60477	3×10^6	0.9937
DL- α -Fosfatidiletanolamina	-1086.7	1×10^6	0.9999
L- α -Fosfatidilcolina	1514.7	1×10^6	0.9999
Esfingomielina	351.48	6×10^5	0.9999
L- α -Fosfatidil-L-serina	26171	2×10^6	0.9997

5.3. - RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

5.3.1. - Fosfolípidos.

El procedimiento cromatográfico utilizado para el análisis de fosfolípidos es una modificación del propuesto por Shafiq-Ur-Rheman, 1991.

En el desarrollo del método se probaron varias proporciones de la fase móvil (acetonitrilo:metanol:ácido fosfórico 85%) (100:10:1.8; 60:40:1.8; 50:50:1,8 y 50:50:2.5) y se ensayaron diferentes flujos 1, 1.5 y 1.7 mL/min; observándose que cuando se aumentaba la cantidad de ácido fosfórico de la fase móvil se acortaba el tiempo de análisis pero no se conseguía una resolución óptima. La temperatura de la columna fue variada entre 25 y 30 °C.

La mejor resolución se obtuvo cuando se utilizó como fase móvil acetonitrilo:metanol:ácido fosfórico 85% (50:50:1,8) a un flujo de 1.5 mL/min y con la columna termostataada a 28 °C.

La identificación de los fosfolípidos se hizo por comparación de sus tiempos de retención con los de los correspondientes patrones. Con el fin de seleccionar la longitud de onda óptima se llevó a cabo un scan entre 200 y 210 nm utilizando los patrones, se encontró que la longitud de onda a la que todos los compuestos presentaban el máximo de absorbancia era 205 nm y por ello se eligió dicha longitud de onda para efectuar los análisis.

En la Figura 5.3 se representa el contenido en fosfolípidos en erizo de mar, *Paracentrotus lividus* en ambos tipos de muestra.

El límite de detección de cada componente fue calculado siguiendo las normas de la ACS (1980). Los resultados ($\mu\text{g/mL}$) son dados en la Tabla 5.II.

Para determinar la precisión de la medida una serie de ocho alícuotas de la misma solución fueron inyectadas en el cromatógrafo. En la precisión del método una serie de ocho alícuotas de la misma muestra fueron sometidas al proceso completo. Las desviaciones estándar relativas (RSD%) se muestran en la Tabla 5.II.

Para el estudio de la recuperación del método, se sobrecargó la muestra con concentraciones conocidas de los correspondientes patrones y se comprobó que los valores obtenidos expresados en % fueron de 92.15, 93.82, 93.44, 103.13 y 95.47 para el fosfatidilinositol, la fosfatidilserina, la fosfatidiletanolamina, la fosfatidilcolina y la esfingomielina respectivamente.

Los fosfolípidos predominantes en ambos tipos de muestra son la DL- α -fosfatidiletanolamina y la L- α -fosfatidilcolina al igual que ocurre en otras especies de erizo de mar, *Hemicentrotus pulcherrimus* (Shimada y Ogura, 1990).

Cuando se comparó el contenido en fosfolípidos en muestras crudas y esterilizadas a 112°C durante 50 minutos, mediante el test de Student, no se observaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) y lo mismo cuando se comparó el contenido total de lípidos en los dos tipos de muestra.

En la Tabla 5.III se recoge el contenido en lípidos totales y en fosfolípidos en muestras frescas y enlatadas. La cantidad de lípidos totales es similar a la obtenida por Montero-Torreiro, 2000.

Los lípidos neutros son los constituyentes mayoritarios de la fracción lipídica total en el erizo de mar *Paracentrotus lividus* (López-Hernández y col; 1999; De la Cruz y col; 2000).

El contenido en fosfolípidos en el erizo de mar, *Paracentrotus lividus*, es más bajo que el de otras especies acuáticas que aparecen citadas en la literatura (Erickson, 1993).

Tabla 5.II. -Precisión de la medida, del método y límites de detección correspondientes a los fosfolípidos identificados en el erizo de mar.

Compuestos	Precisión medida (RSD%)	Precisión método (RSD%)	LD (µg/mL)
L-α-Fosfatidilinositol	1.07	2.41	1.30
DL-α-Fosfatidiletanolamina	1.00	1.32	1.75
L-α-Fosfatidilcolina	2.62	2.67	1.77
Esfingomielina	2.50	2.75	2.35
L-α-Fosfatidil-L-serina	1.29	2.42	3.40

Tabla 5.III. -Contenido en lípidos totales (g/100g de materia seca) y en fosfolípidos (mg/100g de materia seca) Los valores mostrados son (promedio±SD) correspondiente a ocho muestras analizadas por duplicado.

Compuesto	Muestras frescas	Muestras esterilizadas
L-α-Fosfatidilinositol	50.65±3.22	51.52±3.02
DL-α-Fosfatidiletanolamina	272.77±23.08	276.29±37.13
L-α-Fosfatidilcolina	211.32±19.92	228.47±17.78
Esfingomielina	5.53±0.15	5.12±0.33
L-α-Fosfatidil-L-serina	117.49±8.88	121.32±7.77
Lípidos totales	12.71±3.16	11.12±1.02

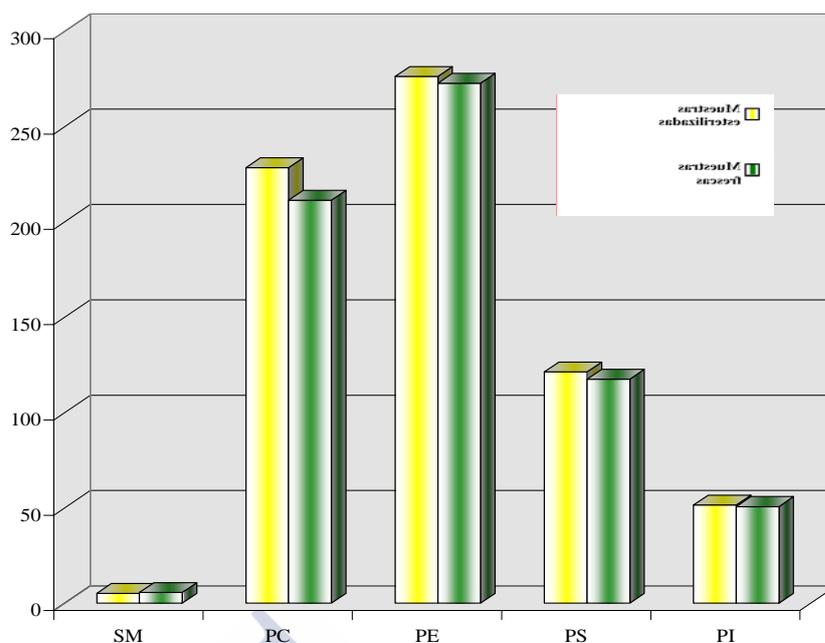


Figura 5.3. - Contenido en fosfolípidos en muestras frescas y esterilizadas en erizo de mar, *Paracentrotus lividus*.

5.3.2. - Ácidos grasos.

La composición en ésteres metílicos de los ácidos grasos expresada en g /100g de materia seca en ambos tipos de muestra, se presenta en la Tabla 5.IV. Los ácidos grasos poliinsaturados son más abundantes (44.7%) que los saturados (35.0%) y éstos claramente prevalecen sobre los ácidos grasos monoinsaturados (20.3%).

Se ha encontrado una relación ω -3/ ω -6 de 6.7 siendo más alta que la encontrada por Fernández-Reiriz y col; 1996 en mejillones. La relación ω -3/ ω -6 es un indicador de gran importancia para la nutrición humana, debido a que hay varios estudios que muestran que dietas ricas en ácidos grasos ω -6 están relacionadas con un incremento en la incidencia de cáncer de mama, colon y de próstata (Carroll y Khor,1971) mientras que dietas ricas

en ácidos grasos ω -3 tienen efectos beneficiosos sobre distintos tipos de tumores malignos (Kaizer, y col; 1989).

Los ácidos grasos mayoritarios son el 16:0 (19.9 % del total), los 20:5 ω -3 (16.5%), 20:3 ω -3 (14.5%) y 14:0 (10.6%) siendo los mismos que los encontrados por Serrazenati y col; 1995 para *Paracentrotus lividus* del mar Adriático y para otras especies equinoideas (Tagaki y col; 1980) aunque en diferente proporción.

En la figura 5.4 se muestra el cromatograma de los ésteres metílicos de los ácidos grasos correspondientes a una muestra.

El proceso de enlatado en agua no produce cambios significativos ($p \leq 0.05$) en la cantidad de cada ácido graso. Sin embargo García-Arias y col; 1994 observan cambios en el contenido en ácidos grasos y especialmente una disminución importante en la relación ω -3/ ω -6 en atún enlatado en aceite. Este diferente comportamiento puede ser explicado por el empleo de un medio de relleno distinto (Aubourg y col; 1997).

Tabla 5.IV. - Composición en ácidos grasos (g/100g de materia seca) en erizo de mar, *Paracentrotus lividus*, antes y después del proceso de esterilización. Los valores mostrados son (promedios \pm SD) correspondientes a cinco muestras analizadas por duplicado.

Ácidos grasos	Muestras frescas $\bar{X} \pm SD$	Muestras esterilizadas $\bar{X} \pm SD$
1 14:0	1.49 \pm 0.15	1.48 \pm 0.09
2 16:0	2.81 \pm 0.31	2.85 \pm 0.21
3 16:1 ω 7	0.455 \pm 0.051	0.445 \pm 0.036
4 17:0	0.025 \pm 0.004	0.025 \pm 0.002
5 18:0	0.473 \pm 0.075	0.447 \pm 0.038
6 18:1 ω 9	0.277 \pm 0.039	0.262 \pm 0.032
7 18:1 ω 7	0.417 \pm 0.065	0.413 \pm 0.044
8 18:2 ω 6	0.134 \pm 0.019	0.148 \pm 0.022
9 18:3 ω 6	0.040 \pm 0.006	0.040 \pm 0.005
10 18:3 ω 3	0.268 \pm 0.040	0.274 \pm 0.032
11 18:4 ω 3	0.510 \pm 0.074	0.505 \pm 0.060
12 20:0	0.139 \pm 0.035	0.129 \pm 0.021
13 20:1 ω 9	1.20 \pm 0.24	1.17 \pm 0.17
14 20:2 ω 6	0.210 \pm 0.036	0.245 \pm 0.052
15 20:3 ω 6	0.061 \pm 0.012	0.062 \pm 0.008
16 20:3 ω 3	2.05 \pm 0.37	1.90 \pm 0.20
17 20:4 ω 6	0.377 \pm 0.075	0.359 \pm 0.034
18 20:5 ω 3	2.33 \pm 0.42	1.92 \pm 0.19
19 22:1 ω 9	0.519 \pm 0.147	0.455 \pm 0.087
20 22:6 ω 3	0.356 \pm 0.092	0.312 \pm 0.056

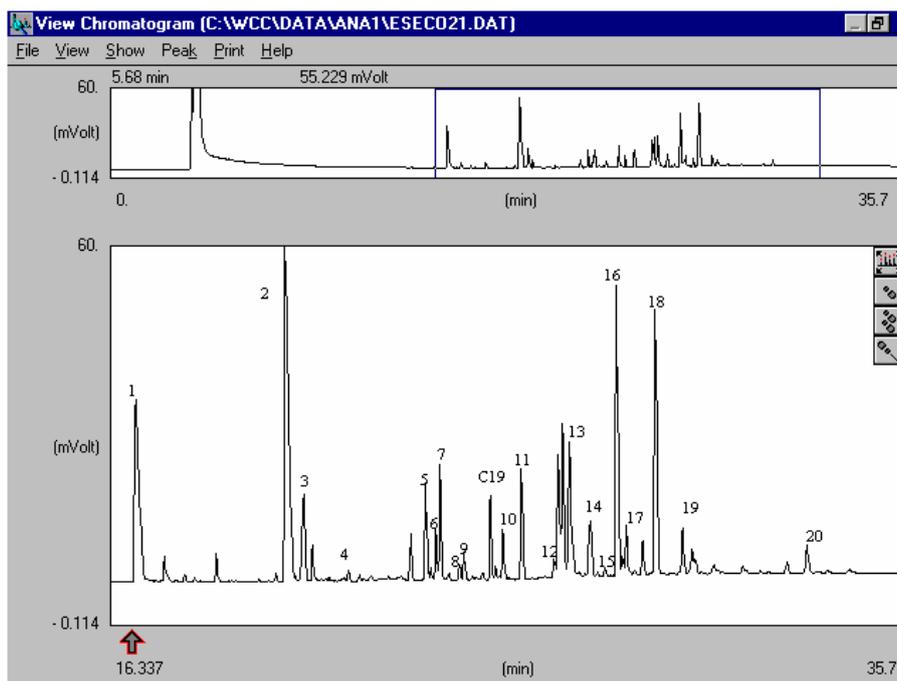


Figura 5.4. - Cromatograma de los ésteres metílicos de los ácidos grasos correspondiente a una muestra.

5.4. - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

Ackman, R. G.(1989). “Nutritional composition of fats in seafoods”. *Prog Food Nutr Sci.* 13:161-241.

Alaiz, M; Galan, H; Millan, F; Zamora, R; Hidalgo, F.J; Maza, M. P. y Vioque, E. (1989). “Analysis of polyunsaturated fatty acids by high performance liquid chromatography of their p-phenylazophenacyl esters”. *Grasas y aceites.* 40(1): 30-34.

American Chemical Society (ACS) (1980). Subcommittee on environmental analytical chemistry. “Guidelines for data acquisition and data quality evaluation in environmental chemistry”. *Anal. Chem.* 52:2242-2280.

Andrade, A.D. Rubira, A.F; Matsushita, M.y Souza, N.E.(1995). “ omega3 Fatty acids in freshwater fish from south Brazil”. *J Am Oil Chem Soc.* 72(10): 1207-1210.

Aubourg, S; Gallardo, J.M. y Medina, I. (1997). “Changes in lipids during different sterilizing conditions in canning albacore (*Thunnus alalunga*) in oil”. *Int J Food Sci Technol.* 32:427-431.

Banerjee, D; Pal, D; Patra, T.K; Misra, S. y Ghosh, A. (1997). “Lipids and fatty acids of air breathing fish *Boleophthalmus boddarti*”. *Food Chem.* 60(3):303-309.

Belitz, H. D. y Grosch, W. (1988). “Química de los alimentos”. Ed Acribia, Zaragoza, 2ªedn. Cap.3.

Bligh, E. G. y Dyer, W. J.(1959). “A rapid method of total lipid extraction and purification”. *Can J Biochem. Phys.* 37:911-917.

Bünger, H. y Pison, U. (1995). “Quantitative analysis of pulmonary surfactant phospholipids by high performance liquid chromatography with light-scattering detection”. *J. Chromatogr B.* 672(1): 25-31.

Carroll, K.K. y Khor, H.T.(1971). “Effects on level type of dietary fat on incidence of mammary tumours induced in female sprague-Dawley rats by 7,12-dimethylbenz(α)anthracene”. *Lipids.* 6:415-420.

Cervera, P, Clapes, J. y rigolfas, R. (1993). “Alimentación y dietoterapia”. Ed. Interamericana- McGraw-Hill. 2ªedn. Cap. 3.

Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos (1993). “Nutrición y dietética. Aspectos sanitarios”. Ed. Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, Madrid 1ªedn. Cap. 3.

Christie, W.W.(1986). “Separation of lipid classes by high performance liquid chromatography with “mass detector”. *J. Chromatogr.*361: 396-399.

De la Cruz-García, C; López-Hernández, J; Gonzalez-Castro, M.J; Rodríguez-Bernaldo de Quirós, A. y Simal-Lozano, J. (2000). “Protein, amino acid and fatty acid contents in raw and canned sea urchin (*Paracentrotus lividus*) harvested in Galicia (NW Spain)”. *J Sci Food Agric.* 80:1189-1192.

Erickson, M. C. (1993): "Lipid extraction from channel catfish muscle: comparison of solvent systems". *J.Food Sci.* 58(1):84-89.

Fennema, O. R. (1993). "Química de los alimentos". Ed. Acribia, Zaragoza, 2ª edn. Cap.4.

Fernández-Reiriz, M.J; Labarta, U. y Babarro, J.M.F. (1996). "Comparative *allometries* in growth and chemical composition of mussel (*Mitillus galloprovincialis* Lmk) cultured in two zones in the Ria Sada (Galicia, NW Spain). *J Shellfish Res.* 15:349-353.

García-Arias, M.T; Sánchez-Muñiz, F.J; Castrillón, A.M. y Navarro, P.(1994). "White tuna canning, total fat, and fatty acids changes during processing and storage". *J Food Compos Anal.* 7:119-130.

Hammond, E.W. (1989). "Chromatographic techniques for lipid analysis". *Trends in Analytical Chemistry.* 8(8): 308-313.

Jasperse, J.L.(1988) "The determination of fatty acids amides by high performance liquid chromatography". *J Am Oil Chem Soc.* 65(11):1804-1807.

Kallio, H; Lehtinen, T; Laasko, P. y Tahvonen, R. (1998). "Fatty acids of a salami-type sausage made of Baltic herring fillets, pork and lard". *Z-Lebensm-Unters-Forsch.* 207 (4): 276-280.

Kinsella, J. E.(1988). "Food lipids and fatty acids: importance in food quality, nutrition and health". *Food Technol.* 42:124-145.

Kaizer, L; Boyd, N.F; Kriucov, V. y Tritcher, D. (1989). "Fish consumption and breast cancer risk. An ecological study". *Nutr Cancer*. 12:61-68.

Lee, T.H; Hoover, R. L; Williams, J. D; Sperling, R.I; Ravalese, J; Spur, B.W; Robinson, D.R; Corey, E.J; Lewis, R.A.y Austin, K.F.(1985). "Effect of dietary enrichment with eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on *in vitro* neutrophil and monocyte leukotriene generation and neutrophil function". *New Engl J Med* 312:1227.

López-Hernández, J; González-Castro, M.J. y Piñeiro- Sotelo, M.(1999). "Determination of sterols in sea urchin gonads by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection". *Journal of Chromatographic Science*. 37:237-239.

Mahan, L. K. y Escott-Stump, S. (2001). "Nutrición y dietoterapia de Krause". Ed. McGraw-Hill Interamericana, 10ªedn. Cap.3.

Montero-Torreiro, M.F. (2000). "Análisis de la composición bioquímica y de posibles biomarcadores de contaminación en el erizo de mar, *Paracentrotus lividus*, Lmk". Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Santiago de Compostela.

Nakamura, T; Fukuda, M. y Tanaka, R. (1996). "Estimation of polyunsaturated fatty acid content in lipids of aquatic organisms using thin-layer chromatography on a plain silica gel plate". *Lipids*. 31(4):427-432.

Pendl, R; Bauber, M; Caviezel, R. y Schulthess, P. (1998). "Determination of total fat in foods and feeds by the Caviezel method based on a gas-chromatographic technique". *JAOAC-Int*. 81(4):907-917.

Serrazenati, G.P; Pagnucco, C; Conte, L.S. y Cattani, O. (1995). "Hydrocarbons, sterols and fatty acids in sea urchin (*Paracentrotus lividus*) of the adriatic sea". *Chemosphere*. 30:1453-1461.

Shafiq-Ur-Rheman. (1991). "Rapid isocratic method for the separation and quantification of major phospholipid classes by high performance liquid chromatography". *J. Chromatogr.B*. 567:29-37.

Shimada, K. y Ogura, N. (1990). "Lipids changes in sea urching during storage". *J Food Sci*. 55(4):967-971.

Sigurgisladottir, S. y Palmadottir, H. (1993). "Fatty acid composition of thirty-five Iceland fish species". *J Am Oil Chem Soc*. 70(11):1081-1087.

Svetashev, V. I. y Zhukova, N.V. (1985). "Analysis of labelled fatty acid methyl esters by argentation and reversed-phase two demensional thin-layer chromatography". *J. Chromatogr*. 330(2): 396-399.

Tagaki, T; Eaton, C. y Ackman, R. G. (1980). "Distribution of fatty acids in lipids of the common Atlantic sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*". *J Fish Res Board Can*. 37:195-202.

Teng, J.I. y Made-Gowda, N.M.(1993). "Analysis of n-3 fatty acids in fish oils by high performance liquid chromatography". *Chromatographia*. 35 (9-12):627-630.

Tsuzuki, W; Ogata, Y; Akasaka, K; Shibata, S. Y Suzuki, T. (1991). "Fatty acids composition of selected buckwheat species by fluorometric high-performance liquid chromatography". *Cereal Chemistry*. 68(4): 365-369.

Ulberth, F. y Henninger, M.(1992). "One-step extraction/methylation method for determining the fatty acid composition of processed foods". *J AOAC*. 69:174-177.





6. - PROTEÍNAS Y AMINOÁCIDOS PROTEINOGENICOS

6.1. - INTRODUCCIÓN.

Los aminoácidos, péptidos y proteínas son componentes importantes de los alimentos. Por un lado proporcionan los elementos necesarios para la síntesis proteica y, por otro, los aminoácidos y péptidos contribuyen directamente al sabor de los alimentos y son precursores de los componentes aromáticos y las sustancias coloreadas que se forman mediante las reacciones térmicas y/o enzimáticas que ocurren durante la obtención, preparación y almacenamiento de los alimentos.

Además las proteínas tienen capacidad para formar geles, espumas, masas, emulsiones y estructuras fibrilares que son esenciales para las propiedades físicas de los alimentos (Belitz y Grosch, 1988).

Por otra parte el carácter indispensable de las proteínas para la materia viviente, convierte en fundamental su presencia en la dieta del ser humano porque, al igual que los animales superiores, necesita de unas fuentes de aminoácidos con las que elaborar sus propias proteínas y esas fuentes han de proceder de las proteínas suministradas con la dieta (Bello Gutierrez, 2000).

La preparación de los alimentos puede tener como consecuencia alteraciones químicas de las proteínas, cuyo tipo y magnitud depende de numerosos parámetros; por ejemplo, de la composición del alimento, de las condiciones del procesado tales como temperatura, pH, presencia de oxígeno. El resultado de tales reacciones puede ser una disminución del valor biológico de la proteína, por ejemplo debido a:

- Destrucción de aminoácidos esenciales.
- Transformación de los aminoácidos esenciales en derivados, que no pueden ser utilizados metabólicamente.

-Disminución de la digestibilidad por uniones intra o intercatenarias (Belitz y Grosch, 1988).

La “calidad”, el “valor” o “equilibrio” de una proteína alimenticia depende de la naturaleza y cantidades de aminoácidos que contiene, lo que representa una medida de la eficacia de cómo el organismo puede utilizar esa proteína.

Una proteína “equilibrada” o de “alta calidad” contiene los aminoácidos indispensables en proporciones correspondientes a las necesidades humanas. (Cheftel y col; 1989).

Las proteínas pueden clasificarse en dos grupos: *homoproteínas* que constan solo de aminoácidos y *heteroproteínas* que además de aminoácidos contienen otros compuestos no proteicos, denominados colectivamente *grupos prostéticos*.

Cada proteína ofrece una conformación característica, es decir una determinada organización tridimensional. Así las proteínas fibrosas están constituídas por cadenas peptídicas dispuestas a lo largo de un eje recto común lo que lleva a la formación de fibras (colágeno, queratina, elastina y fibroína). Por el contrario, las proteínas globulares constan de una o varias cadenas polipeptídicas plegadas sobre sí mismas para formar estructuras tridimensionales esféricas o globulares. Algunas moléculas proteicas reúnen las propiedades características de ambos tipos de proteínas, fibrosas y globulares (actina y fibrinógeno, por ejemplo).

Las proteínas poseen una enorme diversidad de funciones que permite clasificarlas arbitrariamente en tres grupos fundamentales: proteínas estructurales, proteínas con actividad biológica y proteínas alimentarias.

Las proteínas estructurales (queratina, colágeno, elastina, etc.) se encuentran en todos los tejidos: músculos, huesos, piel, órganos internos, membranas celulares y orgánulos intracelulares. Su funcionalidad guarda estrecha relación con su estructura fibrosa.

Las proteínas dotadas de actividad biológica cumplen un papel activo en todos los procesos biológicos. Las proteínas más importantes en este grupo son los enzimas, catalizadores muy específicos.

Las proteínas alimentarias no representan un grupo especial, porque la mayor parte de las proteínas estructural o biológicamente activas descritas son proteínas de los alimentos. Las proteínas alimentarias son simplemente aquellas que resultan digeribles, no tóxicas, relativamente baratas y organolépticamente aceptables para los seres humanos. Las necesidades nutritivas de aminoácidos esenciales para el hombre son conocidas y varían con la edad y las condiciones fisiológicas de los individuos (gestación, lactación, etc) (Fennema, 1993).

También es importante conocer el efecto que sobre ellas ejercen los tratamientos tecnológicos, para poder mejorar sus propiedades, especialmente su calidad nutritiva y sus características funcionales.

Las propiedades funcionales de las proteínas son aquellas propiedades fisicoquímicas que les permiten contribuir a que los alimentos exhiban características deseables.

Los tratamientos térmicos de las proteínas o los alimentos proteínicos en ausencia de sustancias añadidas, pueden tener como consecuencia,

dependiendo de su intensidad desulfuraciones, desaminaciones, isomerizaciones u otras modificaciones químicas de los aminoácidos que a veces van seguidas de la formación de sustancias tóxicas (Fennema,1993).

Los 20 aminoácidos encontrados en las proteínas tienen todos un grupo carboxílico y un grupo amino unidos al mismo átomo de carbono (el carbono α). Difieren unos de otros en sus cadenas laterales, o grupos R, que varían en estructura, tamaño y carga eléctrica y que influyen en la solubilidad en agua de los aminoácidos (Leningher, 1992).

Los aminoácidos pueden clasificarse atendiendo a diferentes criterios, en función de la naturaleza de su grupo R :

- Grupos R apolares alifáticos: glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina.
- Grupos R aromáticos: fenilalanina, tirosina, triptófano.
- Grupos R polares sin carga: serina, treonina, cisteína, metionina, asparagina, glutamina.
- Grupos R cargados negativamente: aspartato, glutamato.
- Grupos R cargados positivamente: lisina, arginina, histidina.

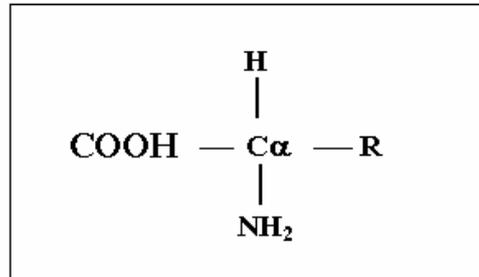
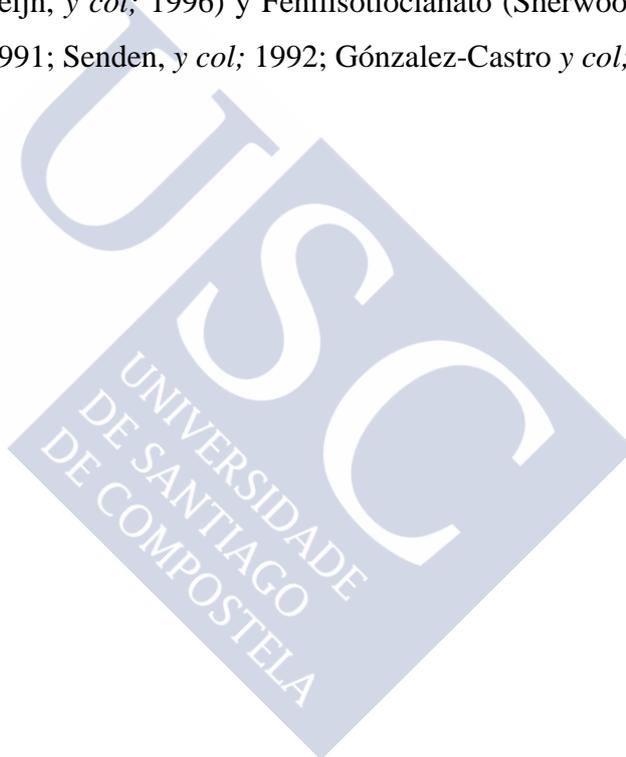


Figura 6.1. - Estructura general de los aminoácidos.

Desde el punto de vista de la nutrición algunos aminoácidos se clasifican como esenciales debido a que la síntesis corporal es inadecuada para satisfacer las necesidades metabólicas y por lo tanto deben ser suplementados como parte de la dieta. Estos aminoácidos son la treonina, triptófano, histidina, lisina, leucina, isoleucina, metionina, valina, fenilalanina y posiblemente arginina (Cain y Munro, 1994).

Los restantes aminoácidos no esenciales: alanina, ácido aspártico, asparagina, ácido glutámico, glicina, prolina y serina, son igualmente importantes para la estructura proteica; sin embargo, si no están presentes las cantidades adecuadas de aminoácidos particulares no esenciales al momento de la síntesis proteica, ellos pueden ser sintetizados ya sea a partir de aminoácidos esenciales o a partir de precursores apropiados de carbono y nitrógeno fácilmente creados en la célula (Mahan y Escott-Stump, 2001).

Entre los métodos más usados para el análisis de aminoácidos se encuentra la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), este tipo de cromatografía a alta presión conduce a mejores separaciones en un tiempo mucho más corto. El empleo de reactivos de derivatización es esencial porque permite la detección espectroscópica y aumenta el grado de hidrofobicidad de los aminoácidos (Nollet, 2000). Entre los reactivos de derivatización más utilizados están el cloruro de dansilo (De Barber y *col*; 1989), 9-Fluorenilmetil cloroformato (Einarsson, y *col*; 1983; Einarsson y *col*; 1986; Schuster, 1988), o-Phtaldialdehido (Ali Qureshi, y *col*; 1984; Rajendra, 1987; Blankenship, y *col*; 1989; Godel y *col*; 1992; Vázquez-Ortiz, y *col*; 1995; Dorresteiijn, y *col*; 1996) y Fenilisotiocianato (Sherwood, 1990; Fierabracci, y *col*; 1991; Senden, y *col*; 1992; González-Castro y *col*; 1997).



6.2- PARTE EXPERIMENTAL.

6.2.1. -Reactivos.

-Patrones de aminoácidos:

- L- Alanina. SIGMA Art. A-7627.CAS 56-41-7.
- L- Arginina. SIGMA Art. A-5131. CAS 74-79-3.
- L- Ácido Aspártico. SIGMA Art. A-9256. CAS 56-84-8.
- L- Ácido Glutámico. SIGMA Art. G-1251.CAS 56-86-0.
- L- Glicina. SIGMA Art. G-7126. CAS 56-40-6.
- L- Histidina. SIGMA Art. H-8125. CAS 71-00-1.
- L- Isoleucina. SIGMA Art. I-2752. CAS 73-32-5.
- L- Leucina. SIGMA Art. L-8000. CAS 61-90-5.
- L- Lisina. SIGMA Art. L-5626. CAS 56-87-1.
- L- Fenilalanina. SIGMA Art. P-2126. CAS 63-91-2.
- Hidroxi-L-Prolina. SIGMA Art. H-6002. CAS 51-35-4.
- L-Prolina. SIGMA Art. P-0380.CAS 147-85-3
- L-Serina. SIGMA Art. S-4500. CAS 56-45-1.
- L-Treonina. SIGMA Art.T-8625. CAS 72-19-5.
- L-Tirosina. SIGMA Art. T-3754. CAS 60-18-4.
- L-Valina. SIGMA Art. V-0500. CAS 72-18-4.

-Agente de derivatización:

- Fenilisotiocianato. SIGMA Art. P-1034.

-Solventes de grado para HPLC:

- Acetonitrilo. SCHARLAU Art. Ac340.
- Agua ultrapura MILI-Q.

-Reactivos de grado para el análisis:

- Ácido clorhídrico. NORMASOLV Art. Nv 034.
- Metanol. SCHARLAU Art. Me 306.
- Trietilamina. SIGMA Art. T-0886.
- Fosfato sódico. MERCK Art.6586.
- Acetato de sodio. MERCK Art.6267.

6.2.2. - Material y aparatos.

- Cromatógrafo de líquidos Spectra-Physics, equipado con una bomba SP8800, válvula Rheodyne y bucle de inyección de 20 μ L.
- Detector UV-VIS Spectra Focus Forward Optical Scanning.
- Columna Spherisorb C-18 de 250 x 4.6 mm y tamaño de partícula de 5 μ m.
- Sistema de termostatación de columna Spectra-Physics SP8792.
- Estufa y bomba de vacío Telstar 8176/T2G6 conectadas entre sí por dos frascos lavadores de gases provistos uno con silicagel como agente desecante e indicador de humedad y otro con soda blanca como agente de retención de vapores de ácido clorhídrico.
- Software PC-1000; Versión 3.0.
- Ordenador 386 IBM con 4MB de memoria RAM con el sistema operativo "Operating System /2" versión 1.2.

6.2.3. - Extracción de la muestra.

Se pesan entorno a 1 g de muestra en tubos pyrex de rosca de 16x25 mm, se adicionan 15 mL de ácido clorhídrico 6N; se hace pasar una corriente de nitrógeno, se tapa rápidamente y se lleva a una estufa a 110 °C durante 24 horas para hidrolizar las proteínas (AOAC, 1990). Tras la hidrólisis el contenido del tubo se filtra a vacío (Whatman N^o 541,

Maidstone, England) para eliminar partículas sólidas, y el filtrado se lleva a 25 mL con agua. Posteriormente se toma una alícuota, se filtra a través de un filtro de 0.50 μm (Millipore, Madrid, Spain) y se procede a la derivatización. Para la derivatización se toman con una micropipeta 50 μL de la muestra de erizo hidrolizada y se llevan a unos viales de 10 mm x 5 mm y se secan a vacío a 65 $^{\circ}\text{C}$ durante 2 horas. A continuación se adicionan 30 μL de metanol-agua-trietilamina (2:2:1) y se seca a vacío. El residuo es derivatizado con 30 μL del reactivo compuesto por metanol-agua-trietilamina-fenilisotiocianato (7:1:1:1), se agita durante 30 segundos y se incuba a temperatura ambiente durante 20 minutos. Finalmente después de completada la reacción el reactivo de derivatización es eliminado con una corriente de nitrógeno y los viales se almacenan a 4 $^{\circ}\text{C}$ hasta el momento del análisis. Antes de la inyección el contenido del vial se disuelve en 150 μL de una solución 5mM de fosfato sódico (pH=7.4) que contiene un 5% de acetonitrilo.

Las proteínas se determinan mediante el método Kjeldahl (AOAC, 1990).

6.2.4. - Preparación de los patrones.

Se prepara una solución madre de aminoácidos en ácido clorhídrico 0.1N. De aquí se toman las cantidades necesarias para establecer una escala, de tal modo que la concentración de cada aminoácido presente en la muestra quede dentro del rango de la escala establecida.

6.2.5. - Condiciones de trabajo.

-Fase móvil: El sistema de elución consta de 2 eluyentes: A= Tampón de acetato de sodio 0.14M conteniendo 0.5 mL/ L de trietilamina y llevado a pH=6.2 con ácido acético glacial y B= Mezcla acetonitrilo:agua (60:40). El gradiente de elución se muestra en la Tabla 6.I.

-Columna termostaticada a 30 °C.

-Detección a 254 nm.

6.2.6. - Cuantificación.

Con la escala patrón preparada se establece una recta de calibrado de cuatro puntos a partir de la cual se calcula la concentración de cada aminoácido presente en la muestra.

Los coeficientes de correlación encontrados son aceptables en todos los casos.

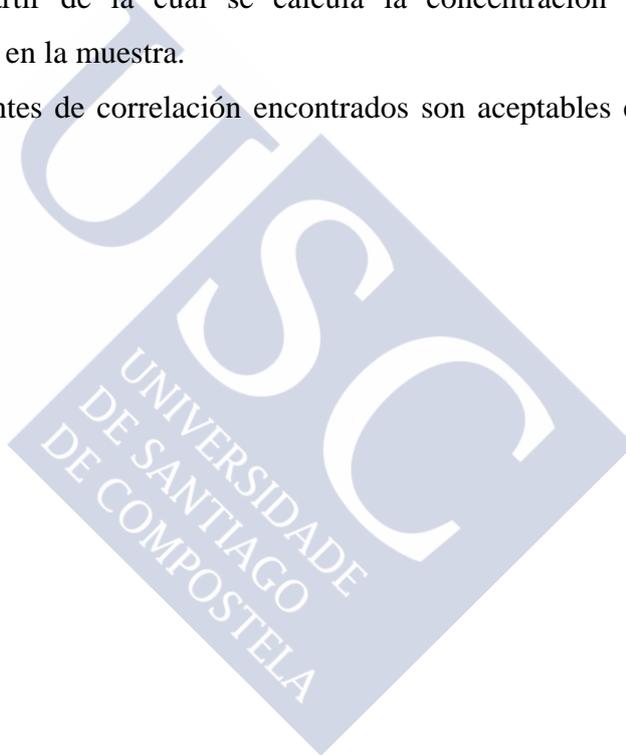


Tabla 6.I. -Gradiente empleado para la separación de los FENILTIOCARBAMIL-AMINOÁCIDOS.

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	%A	%B
0	1.0	90	10
12.0	1.0	70	30
20.0	1.0	52	48
22.0	1.0	0	100
24.0	1.0	0	100
30.0	1.5	0	100
37.0	1.0	90	10



6.3. -RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

EL análisis de las proteínas se realizó según el método de la AOAC (Official Methods of Analysis, 15 th Ed; Washington, DC; 1990).

El contenido proteico en erizo de mar (Promedio \pm SD) es de 56.0 ± 4.56 y 55.3 ± 2.54 (g por 100g de materia seca) para muestras frescas y esterilizadas respectivamente.

Comparando el contenido de proteínas de erizo de mar y otras especies marinas se observa que el contenido proteico es más bajo en erizo de mar que en camarones y cangrejos pero más alto que en ostras y mejillones.

Para la determinación de aminoácidos proteínogénicos se aplicó el método de González-Castro y *col.* 1997 con una pequeña modificación en la cantidad de muestra, adecuándola a la matriz que se estudia.

Con el fin de mejorar la resolución de la treonina, alanina y prolina se ensayaron diferentes pH de la fase móvil (6.0, 5.7 y 5.0) si bien no se consiguió una resolución óptima por lo que se optó por dejar el pH 6.2 del método.

En las figuras 6.2 y 6.3 se muestran los cromatogramas de aminoácidos proteínogénicos de un patrón y una muestra de erizo de mar respectivamente.

La media y la desviación “standard” del contenido de aminoácidos en ambos tipos de muestra se recoge en la Tabla 6.II. Al aplicar el test-t para comparar el contenido en aminoácidos de muestras frescas y esterilizadas a 112°C 50 minutos se observó que las diferencias no eran significativas. En la

figura 6.4 se representa la concentración de aminoácidos en ambos tipos de muestra.

Resultados similares han sido hallados por Pérez-Martín y col;1988, en músculo de *Thunnus alalunga* durante la esterilización a 118 °C 60 minutos y por Kawashima y Yamasaka, 1996 en músculo aductor de *Patinopecten yessoensis* en una esterilización a 110 °C durante 90 minutos.



Tabla 6.II. - Contenido en AMINOÁCIDOS en muestras de erizo de mar *Paracentrotus lividus* (g/100g de materia seca). Los valores mostrados son (Promedios \pm SD) correspondientes a cinco muestras.

Aminoácidos	Muestras frescas	Muestras esterilizadas
Asp	7.56 \pm 0.095	7.08 \pm 0.792
Glu	4.26 \pm 0.206	4.14 \pm 0.367
H-Pro	tr	tr
Ser	1.63 \pm 0.071	1.51 \pm 0.095
Gly	6.15 \pm 0.238	6.19 \pm 0.481
His	0.269 \pm 0.012	0.253 \pm 0.021
Arg	0.145 \pm 0.06	0.167 \pm 0.036
Thr Ala Pro	16.66 \pm 0.706	16.49 \pm 1.34
Tyr	1.35 \pm 0.099	1.22 \pm 0.110
Val	1.95 \pm 0.073	1.94 \pm 0.167
Met	0.131 \pm 0.024	0.122 \pm 0.011
Ile	1.19 \pm 0.076	1.10 \pm 0.078
Leu	3.19 \pm 0.130	3.09 \pm 0.208
Phe	1.48 \pm 0.115	1.36 \pm 0.101
Lys	3.14 \pm 0.146	3.43 \pm 0.649
Total	49.07	48.04

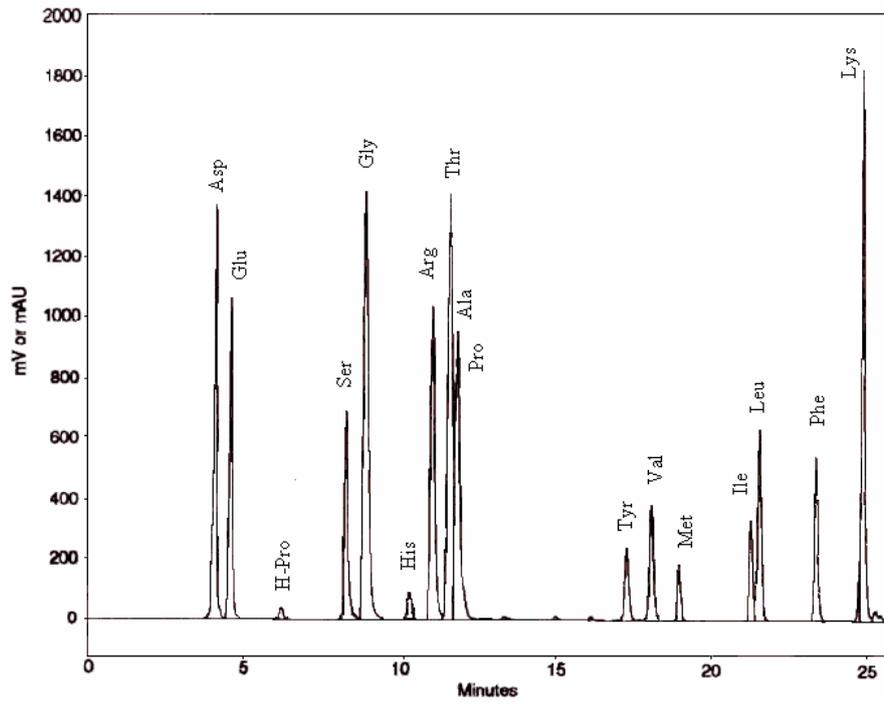
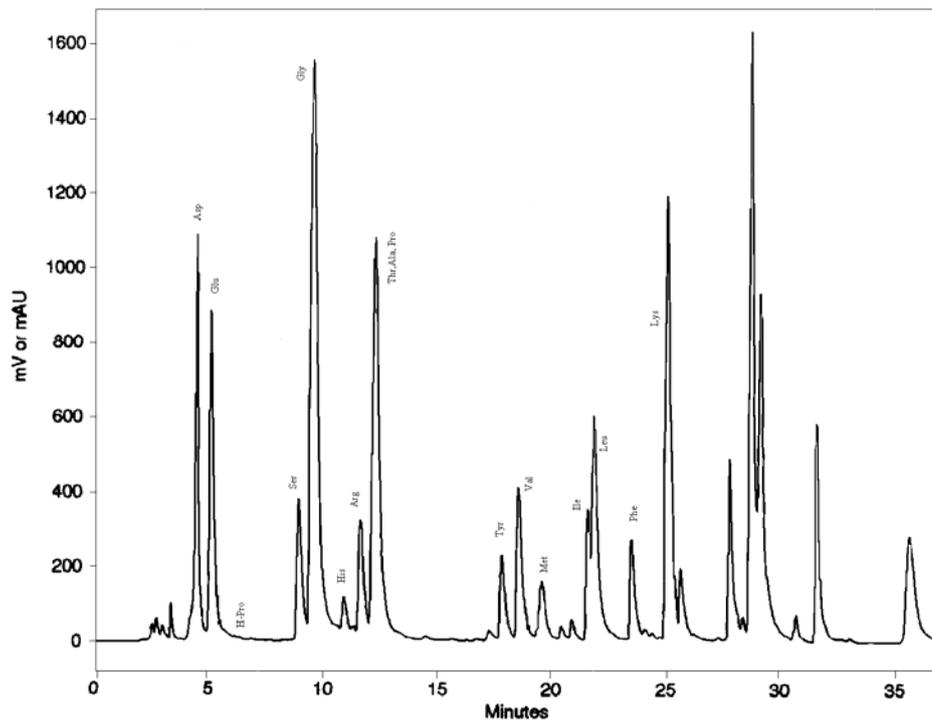


Figura 6.2-Cromatograma de una solución patrón de feniltiocarbamil-aminoácidos.



...n, P y Lagerqvist, S. (1986).

Figura 6.3. -Cromatograma de aminoácidos correspondiente a una muestra de erizo de mar *Paracentrotus lividus*.

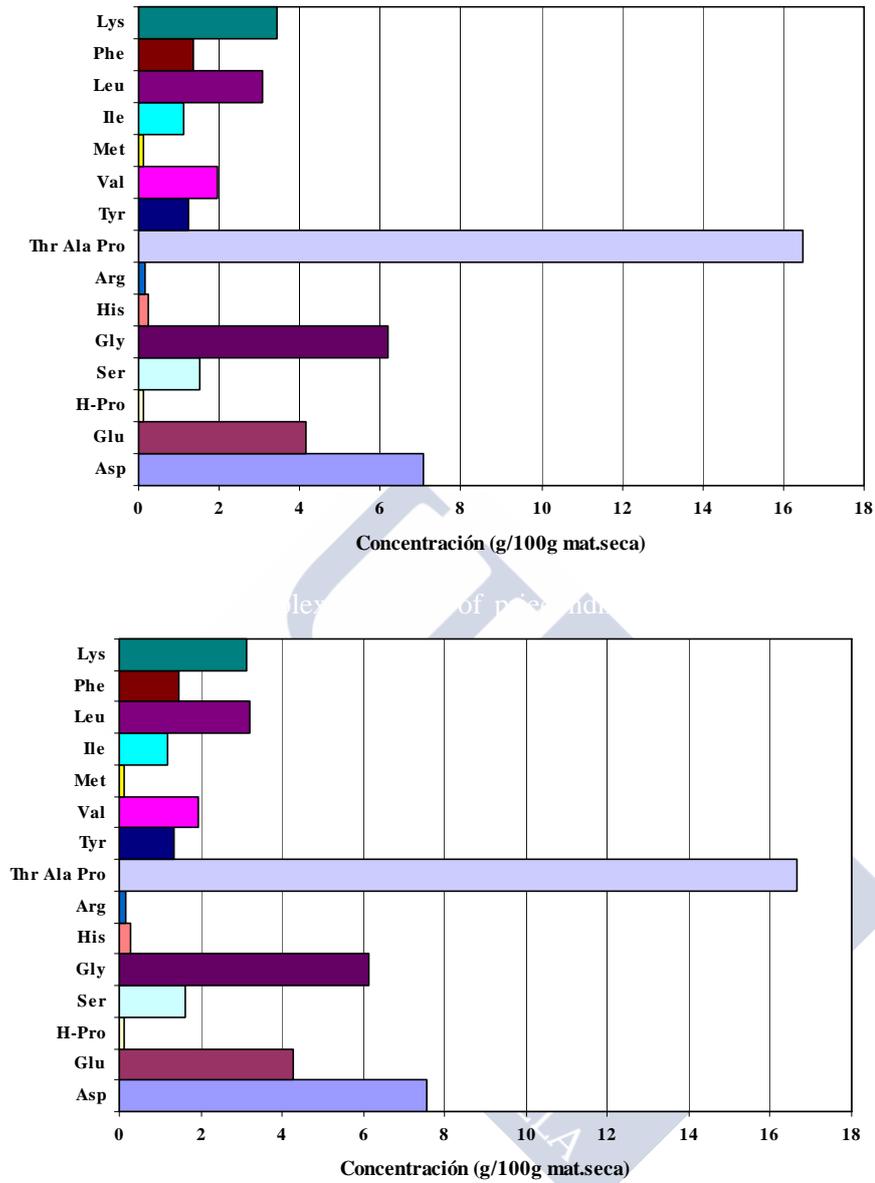


Figura 6.4. -Contenido en aminoácidos en muestras esterilizadas y frescas.

6.4. -REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

Ali Qureshi, G. Fohlin, L. y Bergström, J. (1984). "Application of high-performance liquid chromatography to the determination of free amino acids in physiological fluids." *J. Chromatogr.* 297: 91-100.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists (1990). *Official Methods of Analysis*, 15th edn; Washington, DC.

Belitz, H.D. y Grosch, W. (1988). "Química de los alimentos." Ed. Acribia, Zaragoza. 2^a edn. Cap.1.

Bello Gutierrez, J. (2000). "Ciencia Bromatológica. Principios generales de los alimentos". Ed Díaz de Santos, Madrid. 1^a edn. Cap. 4.

Blankenship, D.T; Krivanek, M.A; Ackerman, B.L. y Cardin, A.D. (1989). "High sensitivity amino acid analysis by derivatization with *o*-phthaldehyde and 9-fluorenylmethyl chloroformate using fluorescence detection: applications in protein structure determination". *Anal Biochem.* 178:227-232.

Cain, M. y Munro, H. (1994). "Modern Nutrition in Health and Disease." Ed. Lea & Febiger, Philadelphia. 8^a edn.

Cheftel, J. C; Cuq, J.L. y Lorient, D. (1989) "Proteínas Alimentarias. Bioquímica. Propiedades funcionales. Valor Nutritivo. Modificaciones químicas" Ed. Acribia, Zaragoza. 1^a edn. Cap. 5.

De Barber, C; Prieto, J.A. y Collar, C. (1989). "Reversed-phase high-performance liquid chromatography analysis of changes in free amino acids during wheat bread dough fermentation." *Cereal Chem.* 66 (4): 283-288.

Dorresteyn, R.C; Berwald, L.G; Zomer,G; De Gooijer, C.D; Wieten, G. y Beuvery, E.C. (1996). "Determination of amino acids using *o*-phthalaldehyde-2-mercaptoethanol derivatization. Effect of reaction conditions." *J. Chromatogr. A.* 724: 159-167.

Einarsson, S; Josefsson, B. y Lagerkvist, S. (1983). "Determination of amino acids with 9-fluorenylmethyl chloroformate and reversed-phase high-performance liquid chromatography." *J. Chromatogr.* 282: 609-618.

Einarsson, S; Folestad, S; Josefsson, B. y Lagerkvist, S. (1986). "High-resolution reversed phase liquid chromatography system for the analysis of complex solutions of primary and secondary amino acids." *Anal.Chem.* 58: 1638-1643.

Fennema, O.R. (1993). "Química de los alimentos". Ed Acribia, Zaragoza. 2ª edn. Cap.5.

Fierabracci, V; Masiello, P; Novelli, M. y Bergamini, E. (1991). "Application of amino acid analysis by high-performance liquid chromatography with phenyl isothiocyanate derivatization to the rapid determination of free amino acids in biological samples." *J. Chromatogr.* 570: 285-291.

Godel, H; Seitz, P. y Verhoef, M. (1992). "Automated amino acid analysis using combined OPA and FMOC-Cl precolumn derivatization". *LC-GC Intl.* 5: 44-49.

González-Castro, M.J; López-Hernández, J; Simal-Lozano, J. y Oruña-Concha, M.J. (1997). "Determination of amino acids in green beans by derivatization with phenylisothiocyanate and high performance liquid chromatography with ultraviolet detection." *J.Chromatogr.Sci.* 35: 181-185.

Kawashima, K. y Yamanaka, H. (1996). "Free amino acids responsible for the browning of cooked scallop adductor muscle." *Fhisherics Sci.* 62:293-296.

Lehninger, A.L; Nelson, D. L y Cox, M.M. (1993). " Principios de Bioquímica." Ed. Omega, Barcelona. 2ª edn. Cap. 5.

Mahan, L. K. y Escott-Stump, S. (2001). "Nutrición y Dietoterapia de Krause." Ed. McGraw-Hill Interamericana, México. 10ª edn. Cap. 5.

Nollet, L.M.L. (2000). "Food analysis by HPLC". Ed. Marcel Dekker, New York, 2ª edn. Cap. 2.

Pérez-Martín, R.I; Franco, J.M; Aubourg, S. y Gallardo, J.M. (1988). "Changes in free amino acid content in albacore (*Thunnus alalunga*) muscle during thermal processing." *Z. Lebensm Untersuch Forsch.* 187: 432-435.

Rajendra, W. (1987). "High performance liquid chromatographic determination of amino acids in biological samples by precolumn

derivatization with *o*-phthaldialdehyde.” *J. Liquid. Chromatogr.* 10 (5): 941-955.

Schuster, R. (1988). “Determination of amino acids in biological, pharmaceutical, plant and food samples by automated precolumn derivatization and high-performance liquid chromatography.” *J. Chromatogr.* 431: 271-284.

Senden, M.H.M.N; Van der Meer, A.J.G.M; Limborgh, J. y Wolterbeek, H.TH. (1992). “Analysis of major tomato xylem organic acids and PITC-derivatives of amino acids by RP-HPLC and UV detection.” *Plant and Soil.* 142: 81-89.

Sherwood, R. A. (1990). “Amino acid measurement by high-performance liquid chromatography using electrochemical detection.” *J. Neurosci. Methods.* 34: 17-22.

Vázquez-Ortiz, F.A; Caire, G; Higuera-Ciapara, I. y Hernández, G. (1995). “High performance liquid chromatographic determination of free amino acids in shrimp.” *J. Liquid. Chromatogr.* 18 (10): 2059-2068.



7. - BASES PÚBLICAS

7.1. - INTRODUCCIÓN.

La hidrólisis total de los ácidos nucleicos da lugar a la liberación de sus distintas unidades estructurales, las bases púricas y pirimidínicas, la D-ribosa o la 2-desoxi-D-ribosa (según se trate de RNA o DNA) y el ácido fosfórico. Si la hidrólisis es incompleta se obtienen combinaciones de aquéllas, denominadas nucleósidos (base púrica o pirimidínica unida a una pentosa) y nucleótidos (base, pentosa y uno, dos o tres grupos fosfato) (Herrera, 1991).

Las dos bases púricas más importantes en los tejidos biológicos son la adenina y la guanina. Derivan de la purina, compuesto formado por la unión de un anillo de pirimidina y otro de imidazol (Herrera, 1991).

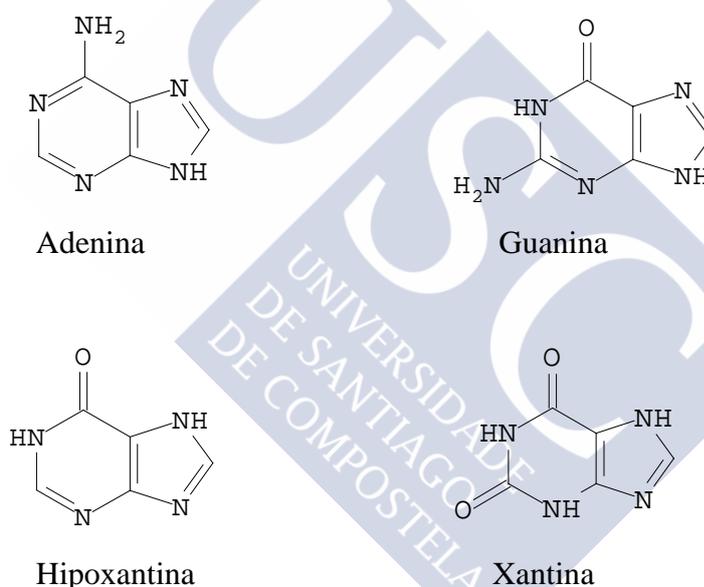


Figura 7.1. -Estructura de las bases púricas identificadas en erizo de mar; *Paracentrotus lividus*.

Además, como nucleótidos o nucleósidos pueden actuar como hormonas y neurotransmisores y están presentes en algunos co-enzimas y otros (cafeína, teobromina) encuentran aplicación en medicina (Joule y *col*; 1995).

Las bases púricas se sintetizan en el organismo a partir de precursores elementales, tales como aminoácidos, CO₂ y unidades de un átomo de carbono. El primer nucleótido púrico de la ruta biosintética es la inosina-5'-fosfato (IMP, cuya base es la hipoxantina), que formará después AMP y GMP (adenosina-5'-fosfato y guanosina-5'-fosfato respectivamente) (Herrera,1991).

Los ácidos nucleicos pueden ser hidrolizados por endonucleasas y exonucleasas a oligonucleótidos y mononucleótidos que a su vez podrán degradarse a nucleósidos y bases. Además los nucleótidos y los nucleósidos procedentes de la hidrólisis de los ácidos nucleicos son recuperados en gran medida para su reutilización, sin ser degradados. La degradación de los nucleótidos púricos procedentes de los ácidos nucleicos endógenos o de la dieta exige su hidrólisis previa a nucleótidos y, por fin, a bases púricas libres.

El AMP, la adenosina y la adenina pueden transformarse por acción de las correspondientes desaminasas en IMP, inosina e hipoxantina respectivamente; de modo similar el GMP, la guanosina y la guanina dan lugar a XMP, xantosina y xantina.

Las bases púricas libres deben convertirse primero en xantina para ser degradadas; así la guanina es desaminada por la guanasa y la adenina por la

adenosina desaminasa a hipoxantina que, a su vez, es oxidada a xantina por acción de la xantina oxidasa.

El ácido úrico producto final de la degradación de las purinas en el hombre es excretado como urato en la orina junto con pequeñas cantidades de hipoxantina y xantina (Herrera, 1991).

El ácido úrico del organismo tiene tres orígenes: a) Origen alimentario a partir de las nucleoproteínas de los alimentos. b) A partir del catabolismo de las nucleoproteínas endocelulares del organismo. c) Por biosíntesis directa a partir de precursores simples: glicocola, CO₂, formilo (Gómez-Recio, 1992).

La gota, es un trastorno del metabolismo de las purinas en el que se acumulan altos niveles de ácido úrico en la sangre (hiperuricemia). En consecuencia se forman uratos de sodio y se depositan en forma de tofos en las articulaciones pequeñas y rodeando los tejidos. En la gota crónica, los sitios típicos de afección son el dedo gordo del pie y el codo. Estos depósitos de urato destruyen los tejidos articulares y generan síntomas crónicos de artritis.

Aunque la gota es una enfermedad hereditaria, hay otros factores etiológicos como son el sexo, la sobrealimentación, el alcohol y el ayuno. En cuanto al sexo, en un 90% se trata de varones; en lo que a la sobrealimentación se refiere suele tratarse de personas que ingieren grandes cantidades de carne; el efecto del alcohol no es directamente proporcional a la cantidad sino al contenido de sustancias nitrogenadas y el ayuno

prolongado durante varios días pueden desencadenar una crisis de gota debido a la cetosis (Gómez-Recio, 1992).

Si bien se ha tratado tradicionalmente la gota con una dieta baja en purinas, los medicamentos han reemplazado la necesidad de restricción rígida de las mismas (Mahnan y Escott-Stump, 2001).

Existe también una gota secundaria originada por una disminución de la excreción de ácido úrico que aparece en la renopatía crónica, en la enfermedad cardiovascular hipertensiva y en la inanición durante el tratamiento de la obesidad (Anderson y *col*; 1985).

Otra utilidad de las purinas, específicamente de la hipoxantina, es su utilización como indicador de la autólisis, en particular en el pescado. Tras la muerte del animal el ATP muscular se va degradando progresivamente a IMP y a hipoxantina. El IMP es capaz de actuar como potenciador del sabor, mientras que la hipoxantina se utiliza a menudo como indicador de calidad, ya que va aumentando a medida que avanza el periodo post-mortem (Robinson, 1991).

Las bases púricas se encuentran en cantidad moderada-alta en los productos marinos, siendo la hipoxantina la base predominante en pescados, crustáceos y moluscos, y la adenina la más abundante en mariscos (Lou y *col*; 1996).

Las técnicas cromatográficas han sido ampliamente utilizadas para el análisis de purinas ya sea cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Cohen, 1983; Hatch y Sevanian, 1984; Herbel y Montag, 1984; Brulé y *col*;

1988; Scherte y Eichler, 1990; Czauderna y Kowalczyk, 1997; Gamberini y *col;* 1992; Lou, 1998) o bien cromatografía de gases con detector de ionización de llama (Cambero y *col;* 2000), con detector de captura de iones (Simek y *col;* 1994) y también cromatografía de gases-espectrometría de masas (Hamberg y Zhang1995).



7.2. - PARTE EXPERIMENTAL.

7.2.1. - Reactivos.

- Patrones de bases púricas:
 - Adenina. SIGMA Art. A-8626. CAS 73-24-5.
 - Hipoxantina. SIGMA Art. H-9377. CAS 68-94-0.
 - Xantina. SIGMA Art. X-4002. CAS 69-89-6.
 - Guanina. SIGMA Art. G-6779. CAS 73-40-5.
 - Adenosina 5'-monofosfato (AMP). SIGMA Art. A-1752. CAS 149022-10-8.
 - Guanosina 5'-monofosfato (GMP). SIGMA Art. G-8377. CAS 5550-12-9.
 - Inosina 5'-monofosfato (IMP). SIGMA Art. I-4625. CAS 4691-65-0.
 - Xantosina 5'-monofosfato (XMP). SIGMA Art. X-1000. CAS 25899-70-1.

- Reactivos de grado para el análisis:
 - Fosfato potásico dihidrogenado. MERCK Art. 104873.

- Solventes de grado para el análisis:
 - Ácido orto-fosfórico. MERCK Art. 1805.
 - Ácido fórmico 98-100%. MERCK Art. 263.
 - Ácido trifluoroacético. SIGMA Art. T-6508.

El agua utilizada para todas las soluciones se obtuvo a partir de un sistema de purificación del agua Mili-Q (Millipore).

7.2.2. – Material y aparatos.

- Cromatógrafo de líquidos Spectra-Physics, equipado con una bomba SP8800, válvula Rheodyne y bucle de inyección de 20 μ L.
- Detector UV-Vis Spectra Focus Forward Optical Scanning.
- Columna Spherisorb ODS 2 (C-18) de 250x 4.6 mm y tamaño de partícula de 5 μ .
- Software PC1000 versión 3.0.
- Ordenador 386 IBM con 4MB de memoria RAM, con el sistema operativo “Operating system/2” versión 1.2.
- Rotavapor Buchi.
- Sistema de termostatación de columna Spectra-Physics SP8792.

7.2.3. - Extracción de la muestra.

Se pesan 200 mg de muestra previamente homogenizada en un matraz de fondo redondo, se añaden 5 mL de ácido fórmico y 5mL de ácido trifluoroacético bajo campana de extracción. Se calienta la mezcla a reflujo durante 15 minutos en un baño termostatzado a 90 °C. Una vez transcurrido este tiempo se evapora en el rotavapor a 75 °C aproximadamente durante 10 minutos. El residuo seco obtenido se redisuelve en 10 mL de fosfato potásico dihidrogenado 0.3M. Finalmente se filtra una alícuota a través de un filtro Millipore de 0.22 μ m para eliminar las partículas no solubles y se inyecta en el cromatógrafo.

7.2.4. - Preparación de los patrones.

Se prepara una solución madre con las bases púricas en fosfato potásico dihidrogenado 0.3M. De aquí se toman las porciones necesarias para

establecer una escala de tal forma que las concentraciones de las bases púricas en la muestra queden en el rango de la escala establecida.

7.2.5. - Condiciones de trabajo.

-Fase móvil: Consta de una solución de fosfato potásico dihidrogenado 0.3M.

-Gradiente de elución: Flujo de 1mL/min durante los primeros 16 min y flujo de 2 mL/min desde el minuto 16 al minuto 35 en el que finaliza la inyección.

-Detección: Scan entre 200-300 nm, la longitud de onda seleccionada para la cuantificación es 255nm.

-Columna termostatzada a 28 °C.

7.2.6. - Identificación y cuantificación.

La identificación está basada en la comparación de los tiempos de retención y de los espectros UV registrados con el sistema Spectra Focus con los de los patrones correspondientes (Figura 7.4).

Para la cuantificación de las bases púricas, guanina, hipoxantina, xantina y adenina, se efectua la hidrólisis de sus respectivos precursores GMP, IMP, XMP y AMP, sometiéndolos al proceso completo, tras haber comprobado previamente que la hidrólisis de dichos precursores es siempre mayor del 99%.

Se establece así una recta de calibrado, de cuatro puntos, en función de la relación de las áreas de los picos con las concentraciones de los correspondientes patrones. En la Tabla 7.I se muestran las ecuaciones de las rectas correspondientes a cada componente.

Tabla 7.I. -Rectas de calibrado ($y=a+bx$) de los compuestos estudiados.

Compuesto	a	b	r
Guanina	-14853.99	32395.26	0.9999
Hipoxantina	861.65	48230.21	0.9995
Xantina	1354.42	18413.52	0.9999
Adenina	-42154.49	25123.41	0.9999



7.3. - RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Para el análisis de las bases púricas se ha aplicado el método de Lou y *col*; 1997 con algunas modificaciones. En la optimización del método se probaron varias fases móviles:

Fosfato potásico dihidrogenado 0.02M (pH 3.2); fosfato potásico dihidrogenado 0.3M (pH 4); metanol: acetonitrilo: tetrahidrofurano (979:10:10:1) y fosfato potásico dihidrogenado 0.3M (pH 4). Con la primera fase no se lograba una buena resolución; con la segunda se acertaba el tiempo de análisis pero no se conseguía la separación de todos los compuestos, se eligió la tercera porque era la que permitía una mejor resolución de los compuestos.

Se ensayaron varios flujos en régimen isocrático 0.5, 1 y 2 mL, se separaban las purinas, pero con el flujo en gradiente se mejoraba notablemente la separación de los picos y se acertaba el tiempo de análisis.

La temperatura fue variada entre 25 y 30 °C, los mejores resultados se obtuvieron manteniendo la temperatura constante a 28 °C.

Los cromatogramas de un patrón y una muestra obtenidos bajo estas condiciones son mostrados en las Figuras 7.2 y 7.3 respectivamente.

Para determinar la precisión del método, una serie de seis alicuotas de la misma muestra fueron sometidas al proceso completo. Las desviaciones estándar relativas (RDS%) son mostradas en la Tabla 7.II.

El límite de detección de cada componente fue calculado siguiendo las normas ACS (1980). Los resultados ($\mu\text{g/mL}$) se muestran en la Tabla 7.II.

Para el estudio de la recuperación del método, se ha sobrecargado la muestra con concentraciones conocidas de los correspondientes patrones, los valores obtenidos expresados en % se recogen en la Tabla 7.II.

Se analizaron por duplicado un total de 8 muestras inmediatamente después de su recogida y tras un período de 3 y 6 meses de congelación. En los tres conjuntos de muestras se obtiene una cantidad total de purinas de 1.6 g/100 g de materia seca, no encontrando diferencias significativas entre los distintos períodos de congelación al aplicar el test t de Student ($p \leq 0.05$). Sin embargo lo que sí varían son las proporciones de las distintas purinas a lo largo del tiempo, aunque siempre predominan la adenina y la guanina.

En la Tabla 7.III se muestran los resultados de las muestras de erizo analizadas en el presente estudio. Las muestras enlatadas fueron procesadas inmediatamente después de su recogida; el proceso de esterilización al que se someten durante el enlatado inactiva las enzimas responsables del metabolismo de purinas por lo que se consideran muestras frescas en cuanto a la composición purínica.

En los resultados se puede observar una variación en las proporciones de purinas encontradas (figura 7.5), siendo especialmente significativas: la disminución de la guanina a partir del tercer mes de almacenamiento; el constante aumento de la hipoxantina y la disminución de la adenina desde la recogida; y en el caso de la xantina aumenta ligeramente durante los primeros meses para luego disminuir a partir del tercer mes.

Estas variaciones pueden ser debidas a la degradación enzimática

de las bases púricas tras la muerte del animal hasta hipoxantina. En el caso de muestras enlatadas estas modificaciones no se producen debido a la inactivación de las enzimas por calor.

Estos resultados son similares a los encontrados en otros estudios, donde el almacenamiento implica una disminución en la concentración de adenina, guanina y xantina; no ocurre lo mismo con la hipoxantina, cuyo valor aumenta con el tiempo, lo que se relaciona con la frescura del alimento (Lou, 1998).

Tabla 7.II. - Límites de detección, precisión y recuperación del método.

Compuestos	Límite de detección ($\mu\text{g/mL}$)	Precisión método (RSD%)	%Recuperación
Guanina	0.040	3.4	98.51
Hipoxantina	0.060	3.8	99.66
Xantina	0.068	4.5	99.24
Adenina	0.076	2.9	99.76

Tabla 7.III. - Contenido en bases púricas expresado en mg/100g de materia seca correspondiente a 8 muestras diferentes analizadas por duplicado muestras enlatadas y congeladas a los tres y seis meses.

Compuesto	Guanina	Hipoxantina	Xantina	Adenina
Tiempo				
0 meses	699.03±61.86	38.80±2.19	7.67±1.56	822.58±58.27
3 meses	683.42±46.43	179.73±13.79	59.30±17.75	731.59±28.54
6 meses	632.11±48.91	231.02±18.69	37.89±15.83	660.61±59.50



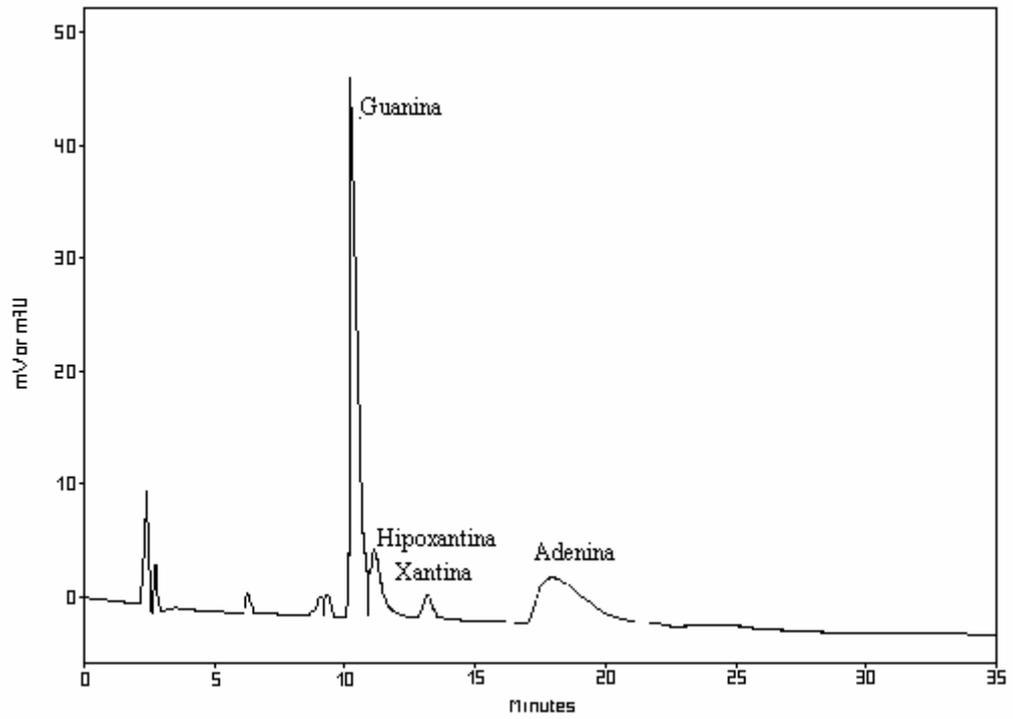


Figura 7.2. -Cromatograma de bases púricas correspondiente a un patrón.

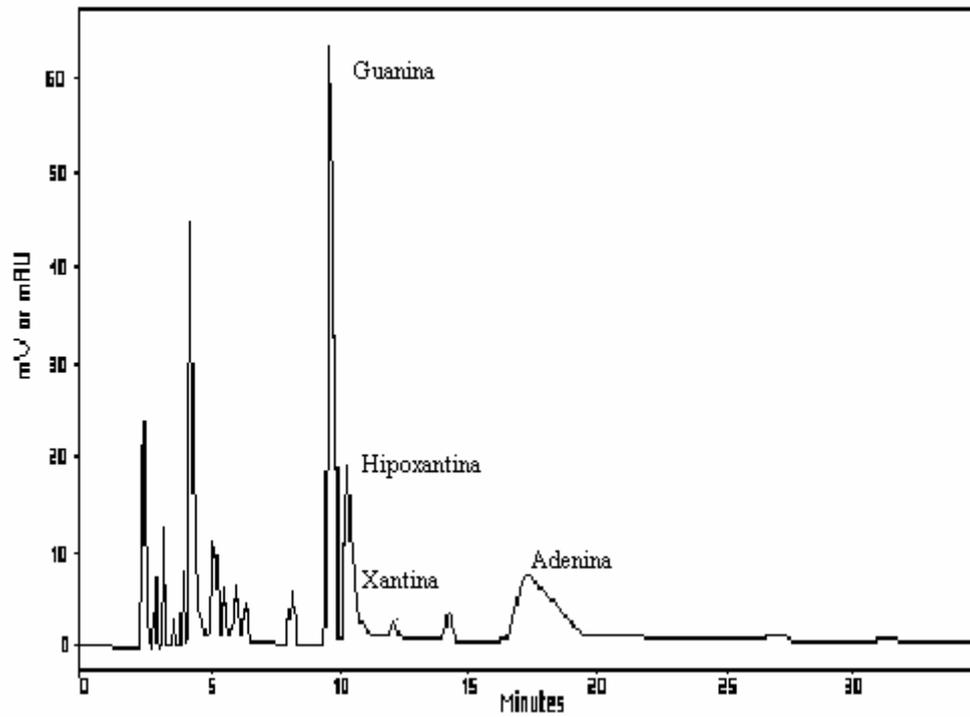
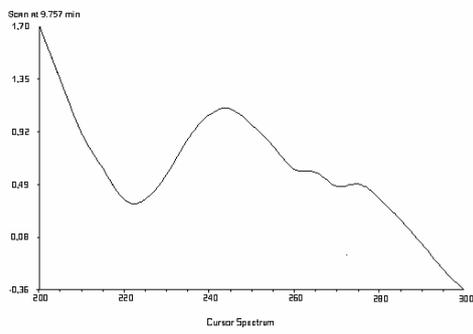
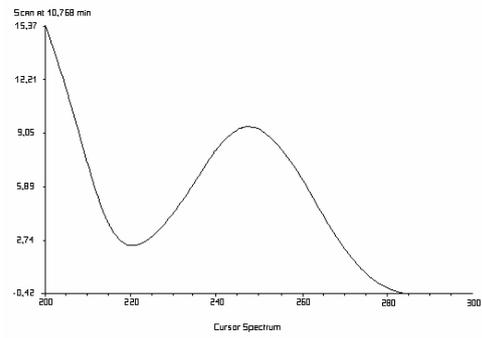


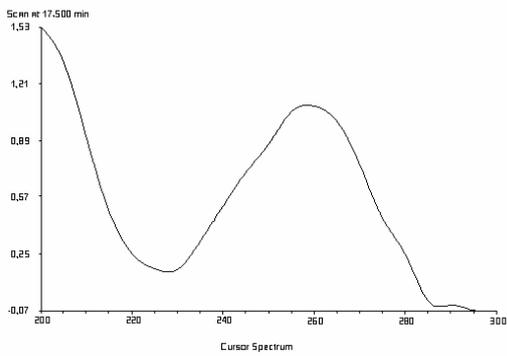
Figura 7.3. - Cromatograma de bases púricas de una muestra de erizo de mar.



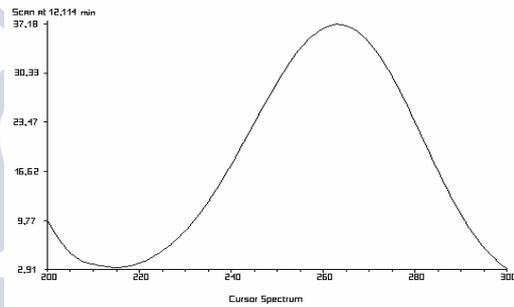
Guanina



Hipoxantina



Adenina



Xantina

Figura 7.4. - Espectros UV de las bases púricas identificadas en erizo de mar, *Paracentrotus lividus*.

EVOLUCIÓN DEL CONTENIDO DE BASES PÚRICAS

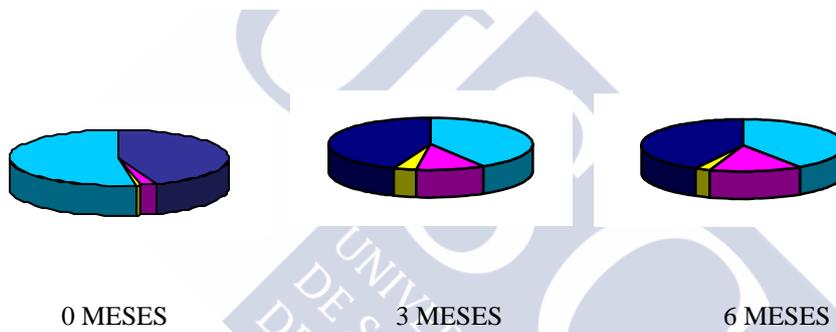
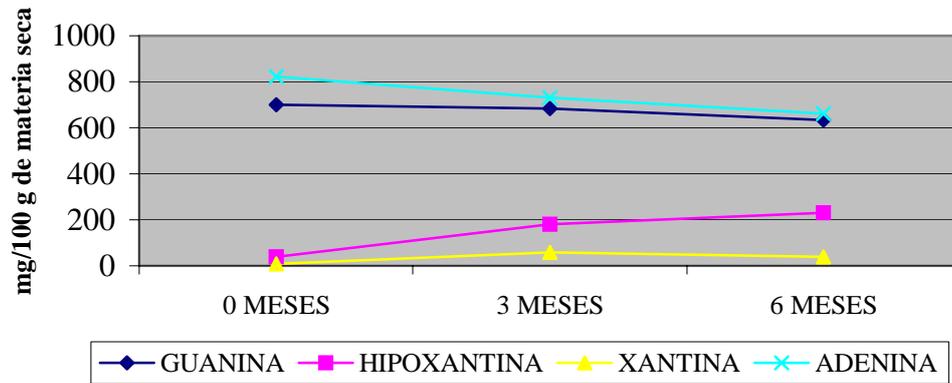


Figura 7.5. – Evolución en el contenido de bases púricas.

7.4. - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

American Chemical Society (ACS) (1980). Subcommittee on environmental analytical chemistry. "Guidelines for data acquisition and data quality evaluation in environmental chemistry". *Anal. Chem.* 52: 2242-2280.

Anderson, L; Dibble, M.V. y Turki, P.R. (1985). "Nutrición y dieta de Cooper". Ed. Interamericana, 17ª edn. Cap.34.

Brulé, D; Sarwar, G. y Savoie, L.(1988). "Purine content of selected canadian food products". *Journal of Food Composition and Analysis.* 1:130-138.

Camero, M.I; Pereira-Lima, C. I; Ordoñez, J.A. y De Fernando, G.D.G. (2000). "Beef broth flavour relation of components with the flavour developed at different cooking temperatures". *J.Sci Food Agric.*80 (10): 1519-1528.

Cohen, A.C. (1983). "A simple, rapid and highly sensitive method of separation and quantification of uric acid, hypoxanthine, and xanthine by HPLC." *Experientia.* 39: 435-436.

Czauderna, M. y Kowalczyk, J. (1997). "Simultaneous measurement of allantoin, uric acid, xanthine and hypoxanthine in blood by high-performance liquid chromatography". *J. Chromatogr. B.* 704: 89-98.

Gamberini, G.; Ferioli, V.; Zeneroli, M. L.; Rustichelli, C. y Baraldi, M. (1992). "A high-performance liquid chromatographic method for the analysis

of adenosine and some metabolites in the brain tissue of rats”.
Chromatographia. 34 (11-12): 563-567.

Gómez-Recio, R. (1992). “Dietética práctica”. Ed Rialp, Madrid 1ª edn,
Cap.5.

Hamberg, M. y Zhang, L. Y. (1995). “Quantitative determination of 8-
hydroxyguanine and guanine by isotope dilution mass spectrometry”.
Analytical Biochemistry. 229 (2): 336-344.

Hatch, L.L.y Sevanian, A. (1984). “Measurement of uric acid, ascorbic acid,
and related metabolites in biological fluids”. *Analytical Biochemistry*. 138:
324-328.

Herbel, W. y Montag, A. (1984). “Determination of individual purine and
pyrimidine bases from protein-rich food by automatic cation-exchange
chromatography after hydrolytic digestion under pressure”. *Z-Lebensm-
Unters-Forsch*. 178 (2): 81-85.

Herrera, E. (1991). “Bioquímica. Aspectos estructurales y vías metabólicas”.
Ed. Interamericana-Mc Graw-Hill, 2ªedn. Cap.32.

Joule, J.A; Mills, K. y Smith, G.F. (1995). “Heterocyclic chemistry”. Ed.
Chapman & Hall. 3ª edn. Cap. 23.

Lou, S; Chen, T. y Chen, H.(1996). “Determination of purine contents in
some selected fishery products”. *Nutritional Sciences Journal*.21(5):433-444.

Lou, S. (1998). "Purine content in grass shrimp during storage as related to freshness". *J. Food Sci.* 63 (3): 442-444.

Lou, S; Chen, T; Lin, C. y Chen, H. (1997). "Effect of cooking on purine contents of some fishes". *Food Science.* 24 (2): 258-262.

Mahnan, L.K. y Escott-Stump, S. (2001). "Nutrición y dietoterapia de, Krause". Ed. Mc Graw-Hill Interamericana. 10ª edn. Cap. 43.

Robinson, D. S. (1991). "Bioquímica y valor nutritivo de los alimentos". Ed. Acribia, Zaragoza, 1ª edn. Cap. 9.

Schertel, B. y Eichler, W. (1990). "HPLC determination of purine and pyrimidine compounds in biological samples: sample preparation and analysis". *Fresenius Journal of Analytical Chemistry.* 337: 69-70.

Simek, P; Jegorov, A. y Dusbábek, F. (1994). "Determination of purine bases and nucleosides by conventional and microbore high-performance liquid-chromatography and gas chromatography with an ion-trap detector". *J. Chromatogr. A.* 679: 195-200.



8. - COMPOSICIÓN NUTRICIONAL

8.1. - COMPOSICIÓN NUTRICIONAL.

Para establecer la composición nutricional del erizo de mar, se ha determinado el contenido en humedad, por desecación en estufa a vacío a 65 °C durante 5 horas, y el contenido en cenizas, por incineración a 550 °C durante 5 horas. El mayor contenido en cenizas en muestras enlatadas con relación a las frescas puede atribuirse al cloruro sódico que se adiciona durante el proceso de enlatado. Los resultados se presentan en la tabla 8.I

Los valores de glucógeno y colesterol forman parte de los resultados del proyecto XUGA 20301B98.

Tabla 8.I. –Contenido en humedad, cenizas, glucógeno y colesterol en muestras frescas y enlatadas.

	Muestras frescas	Muestras enlatadas
Humedad (%)	72.87±0.34	72.98±3.9
Cenizas (g/100g mat.seca)	8.61±0.71	11.12±0.70
Colesterol (mg/100g mat.seca)	896.93±64.15	846.29±57.62
Glucógeno (g/100g mat.seca)	10.60± 1.47	12.30± 2.36

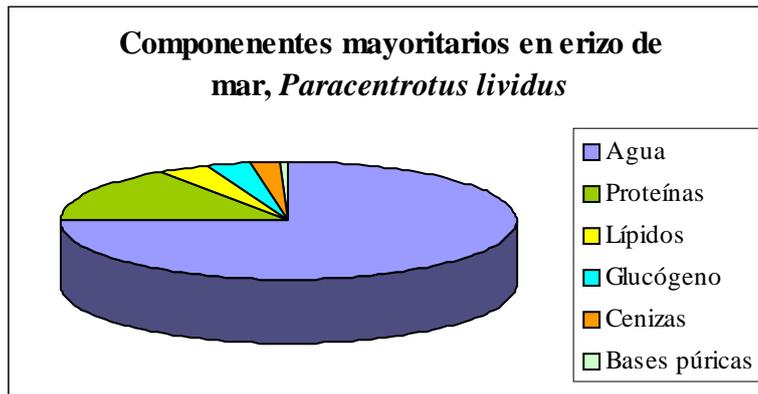


Figura 8.1. - Componentes mayoritarios en muestras frescas de erizo de mar, *Paracentrotus lividus*. El contenido está expresado en g/100g de muestra.

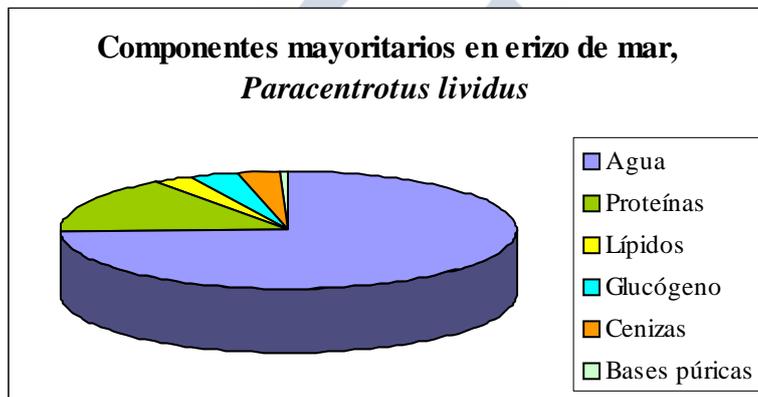
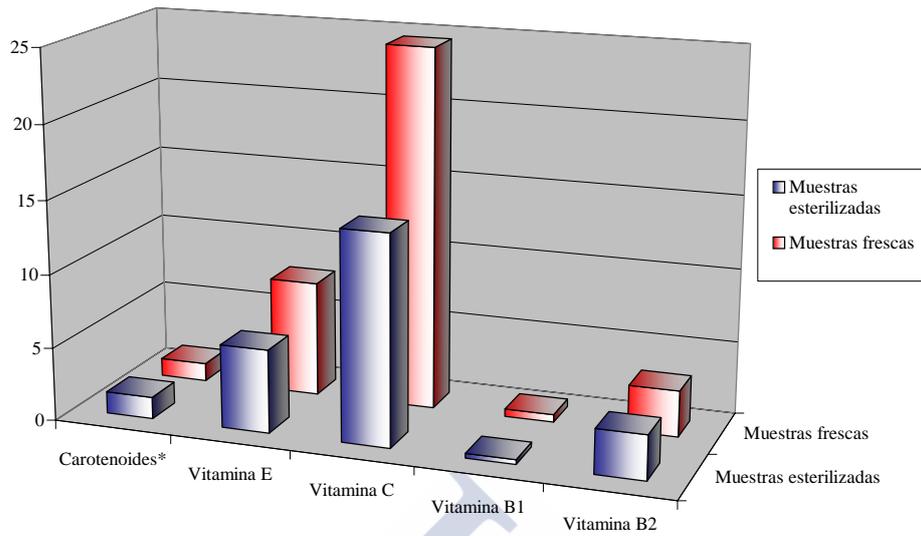


Figura 8.2. - Componentes mayoritarios en muestras esterilizadas de erizo de mar, *Paracentrotus lividus*. El contenido está expresado en g/100g de muestra.

Componentes minoritarios en erizo de mar, *Paracentrotus lividus*



* Carotenoides con actividad vitamina A

Figura 8.2. - Componentes minoritarios en muestras frescas y esterilizadas de erizo de mar, *Paracentrotus lividus*. El contenido está expresado en mg/100g de materia seca excepto en la vitamina C que está expresado en mg/100g de muestra.



9. - CONCLUSIONES

1) La determinación de los compuestos aromáticos se realiza mediante la técnica de espacio de cabeza dinámico con desorción térmica por microondas guiadas y detección mediante espectrometría de masas. La separación de los compuestos volátiles se lleva a cabo utilizando como fase estacionaria una columna apolar DB-5 y como gas portador helio a un flujo de 2.43 mL/min.

Los compuestos identificados pueden incluirse en las siguientes familias químicas: alcoholes, aldehidos, hidrocarburos aromáticos furanos, hidrocarburos, cetonas, compuestos nitrogenados, compuestos sulfurados y terpenos. Durante la esterilización se incrementa el contenido en aldehidos y compuestos sulfurados, decrece el limoneno y aparecen furanos, compuestos nitrogenados y aldehidos ramificados.

2) Para la determinación de tiamina y riboflavina se propone un método de cromatografía líquida de alta resolución que incluye una derivatización de tiamina a tiocromo y detección con fluorescencia. Como fase estacionaria se utiliza una columna C-18 y como fase móvil una mezcla que consta de acetato amónico 0.005M y metanol (72:28). Los valores de recuperación son superiores a 91.35%.

El contenido en tiamina y riboflavina, expresado como $\mu\text{g}/100\text{g}$ de muestra, es de 137.94 y 853.37 en muestras frescas y 87.45 y 815.76 en muestras enlatadas respectivamente.

3) Para el análisis de vitamina C se comparan dos métodos de cromatografía líquida de alta resolución con detección ultravioleta y fluorescencia. Con el método de cromatografía líquida de alta resolución detección ultravioleta se determina directamente el ácido ascórbico y con el método de cromatografía líquida de alta resolución detección fluorescencia primeramente se oxida el

ácido ascórbico a dehidroascórbico y posteriormente se derivatiza para obtener un compuesto fluorescente. En ambos casos como fase estacionaria se utiliza una columna C-18 y como fase móvil una solución acuosa acidificada a pH 2.2 con ácido metafosfórico para el método de cromatografía líquida de alta resolución con detección ultravioleta y una mezcla de metanol: ácido metafosfórico 0.1% (7:3) para el método cromatografía líquida de alta resolución con detector de fluorescencia. La precisión del método expresada como desviación estándar relativa es 6.35% y 0.61% para el método de cromatografía líquida de alta resolución con detección ultravioleta y fluorescencia respectivamente.

El contenido en ácido ascórbico, expresado como mg/100g de muestra es de 26.57 y 14.26 en muestras frescas y enlatadas respectivamente.

4) Los carotenoides se determinan mediante un método de cromatografía líquida de alta resolución usando una columna C-18 como fase estacionaria y un gradiente de acetonitrilo, metanol, diclorometano y hexano como fase móvil. La detección se realiza en la región del visible a 450 nm. Los valores de recuperación se sitúan en el rango de 93.45 a 98.47%.

El carotenoide mayoritario en ambos tipos de muestra es la β -echinenona; dicho compuesto presenta actividad vitamina A.

5) Se propone un método de cromatografía líquida de alta resolución que incluye una saponificación de la muestra con potasa etanólica y extracción con hexano para la determinación de vitaminas liposolubles. La fase estacionaria utilizada es una columna C-18 y la fase móvil una mezcla formada por metanol:acetonitrilo (50:50). Los límites de detección obtenidos según las normas de la ACS (1980) son 1.125 $\mu\text{g/mL}$ para el α -tocoferol y 1.350 $\mu\text{g/mL}$ para el retinol.

En las muestras analizadas no se ha encontrado vitamina A siendo el contenido en vitamina E de 7.86 mg/100g de materia seca en muestras frescas y 5.67 mg/100g de materia seca en muestras enlatadas.

6) Se propone un método de cromatografía de gases con detector de ionización de llama para la determinación de los ácidos grasos en forma de sus ésteres metílicos. Como fase estacionaria se utiliza una columna capilar polar DB-Wax de 60m x 0.32mm id x 0.25 μ m y como gas portador se utiliza helio a un flujo de 1.35 mL/min.

Los ácidos grasos predominantes en ambos tipos de muestra son el 16:0 y el 20:5 ω 3. El proceso de enlatado no produce cambios significativos en la cantidad de cada ácido graso.

Se ha encontrado una relación alta ω 3/ ω 6.

7) Para la separación de los fosfolípidos se propone un método de cromatografía líquida de alta resolución en régimen isocrático. Como fase estacionaria se utiliza una columna de sílica y como fase móvil una mezcla formada por acetonitrilo:metanol:ácido fosfórico (50:50:1.8). Las precisiones del método, expresadas como desviación estándar relativa se sitúan en el rango de 1.32 a 2.75%.

Los fosfolípidos mayoritarios son la fosfatidiletanolamina y la fosfatidilcolina.

El contenido total de fosfolípidos, expresado como mg/100g de materia seca es de 657.76 y 682.72 en muestras frescas y enlatadas respectivamente.

8) Los aminoácidos proteinogénicos se determinan mediante cromatografía líquida de alta resolución previa derivatización de los mismos con fenilisotiocianato. Los feniltiocarbamil derivados se separan utilizando un

gradiente de tampón acetato sódico (0.14M)/acetonitrilo:agua (60:40) como fase móvil y una columna C-18 como fase estacionaria.

Los aminoácidos predominantes son la treonina alanina y prolina. El contenido proteico del erizo de mar es de alrededor de 55g/100g de materia seca.

Al aplicar el test t para comparar el contenido de aminoácidos en muestras frescas y esterilizadas se observa que las diferencias no son significativas.

9) Para la determinación de las bases púricas se propone un método de cromatografía líquida de alta resolución con detección ultravioleta a 255 nm; después de su extracción con ácido fórmico y ácido trifluoroacético. La separación se lleva a cabo utilizando una columna C-18 y como fase móvil una solución de fosfato potásico dihidrogenado 0.3M. Las precisiones del método, se sitúan en el rango de 2.9 a 4.5 (desviación estándar relativa %), las recuperaciones de 98.51 a 99.76 % y los límites de detección de 0.040 a 0.076 µg/mL.

El contenido total de bases púricas es de 1.6 g/100g de materia seca.

El contenido global de purinas durante los diferentes períodos de congelación no varía sin embargo las proporciones de purinas reflejan una disminución de adenina, guanina y xantina y un aumento de hipoxantina dicho aumento está relacionado con la frescura.



10. - APÉNDICE

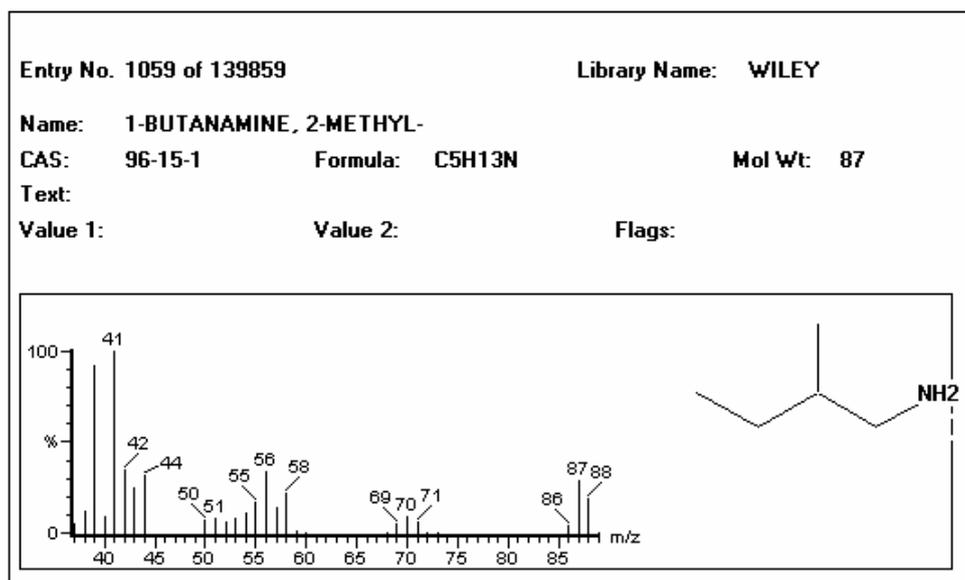


Figura 10.1. - Espectro de masas de la 2-Metil-1-butanamina.

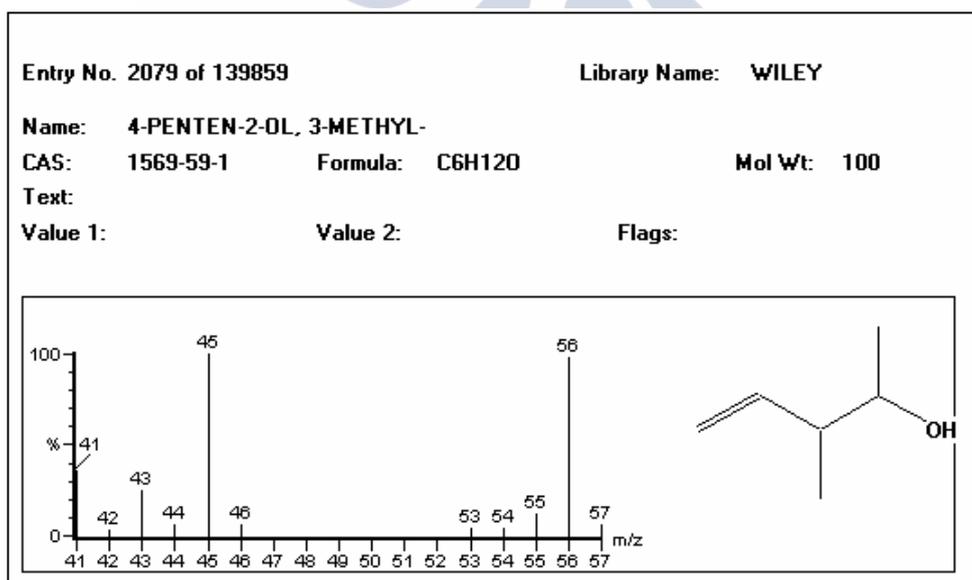


Figura 10.2. -Espectro de masas del 3-Metil-4-penten-2-ol.

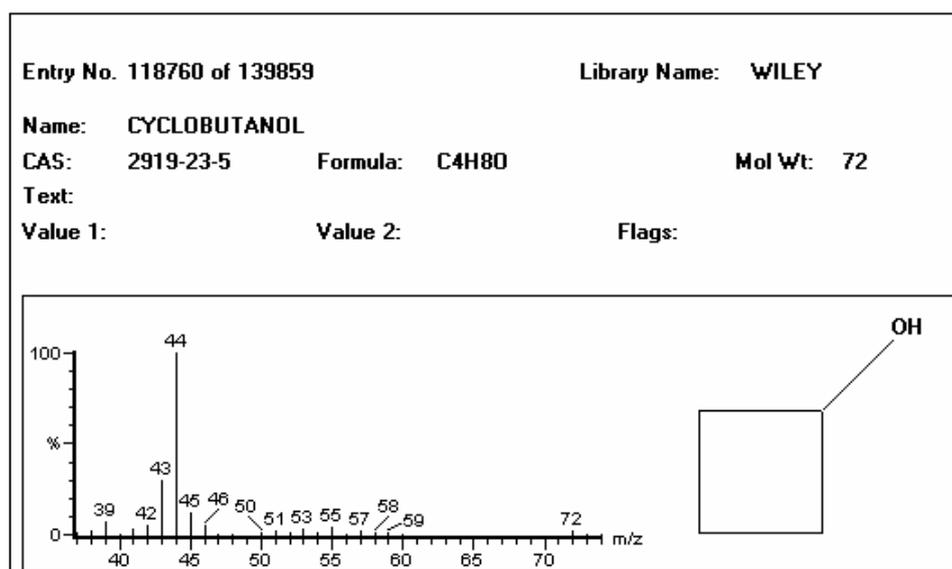


Figura 10.3. - Espectro de masas del Ciclobutanol.

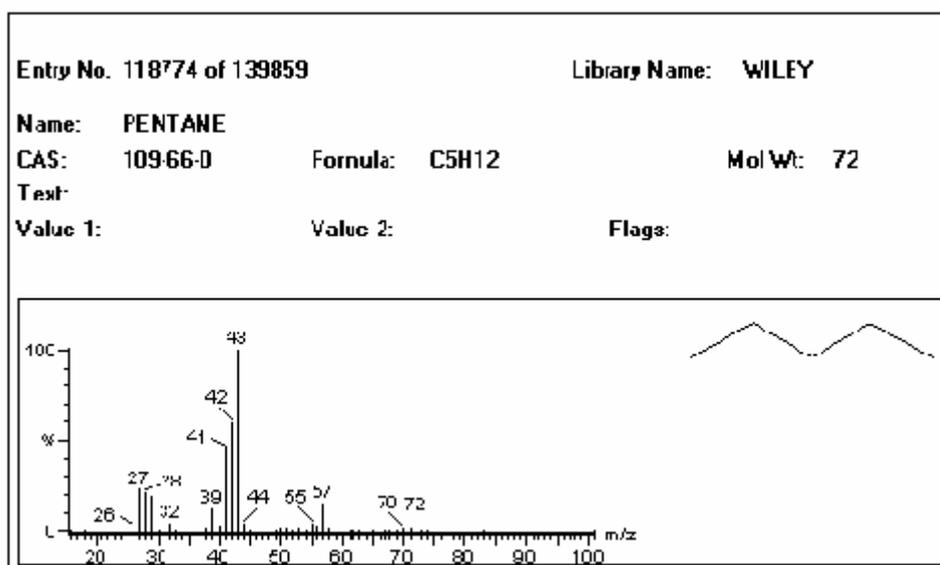


Figura 10.4. - Espectro de masas del Pentano.

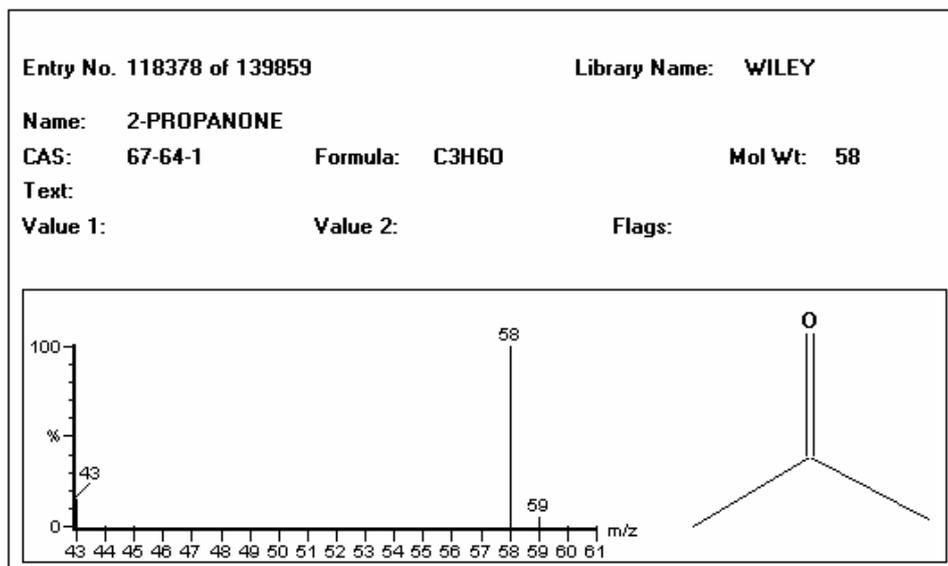


Figura 10.5. - Espectro de masas de la 2-Propanona.

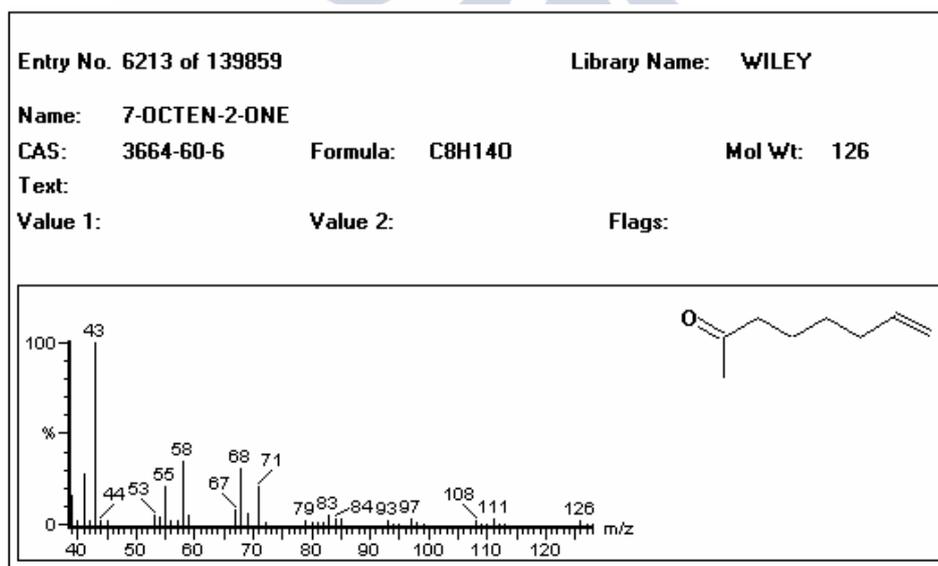


Figura 10.6. - Espectro de masas de la 7-Octen-2-ona.

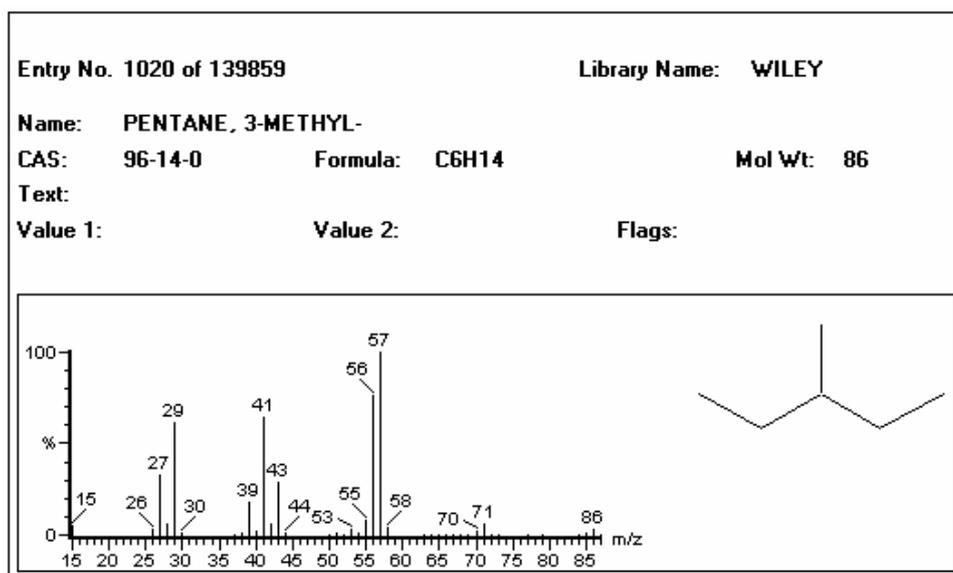


Figura 10.7. - Espectro de masas del 3-Metil-pentano.

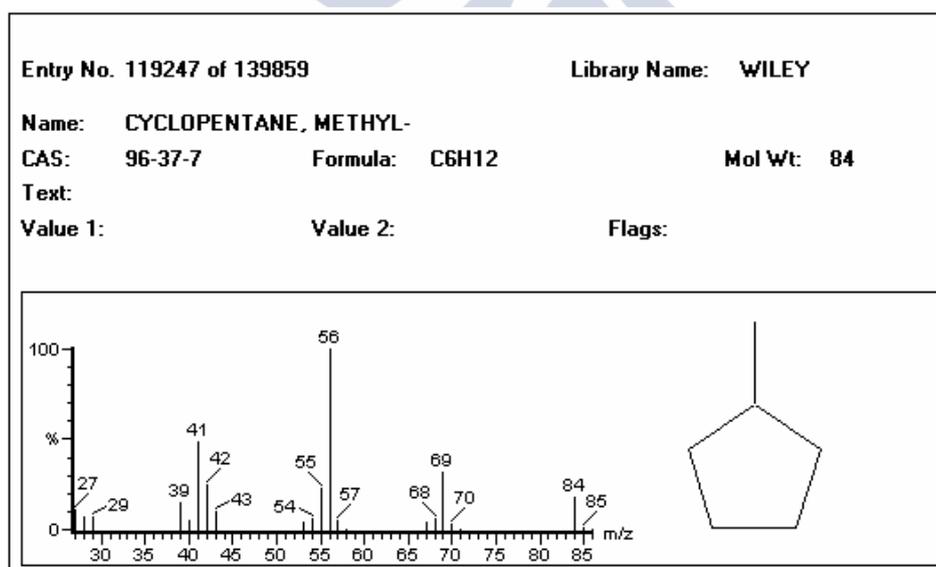


Figura 10.8. -Espectro de masas del Metilciclopentano.

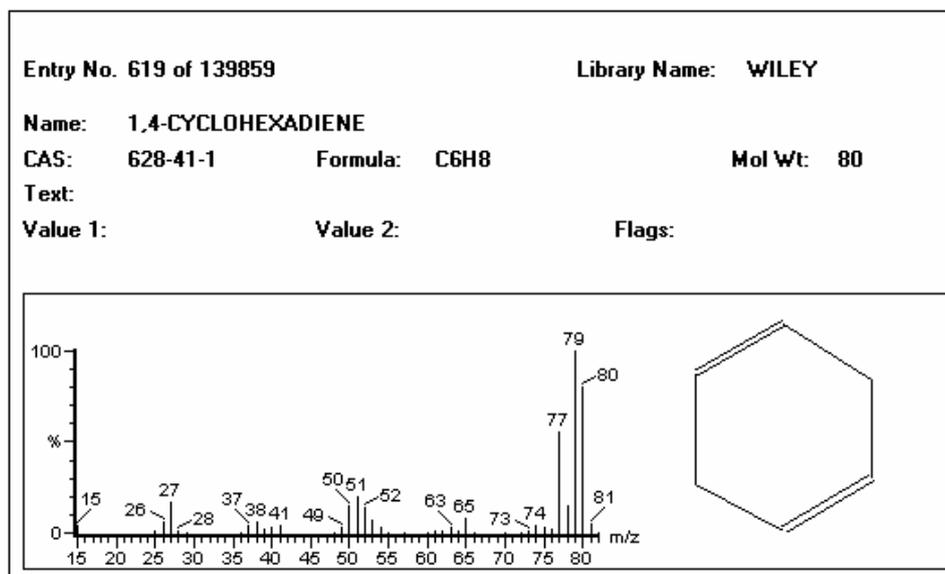


Figura 10.9. -Espectro de masas del 1,4-Ciclohexadieno.

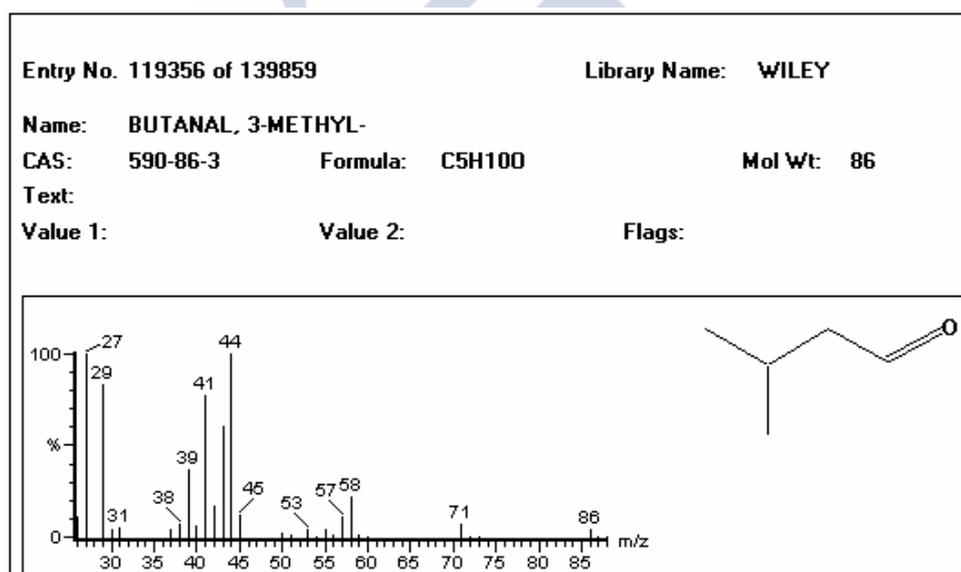


Figura 10.10. - Espectro de masas del 3-Metil-butanal.

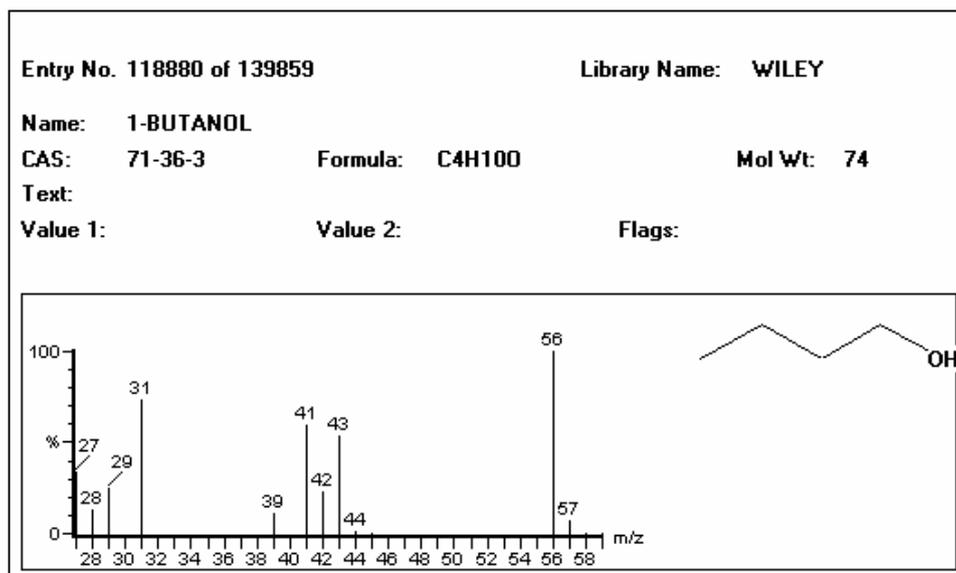


Figura 10.11. - Espectro de masas del 1-Butanol.

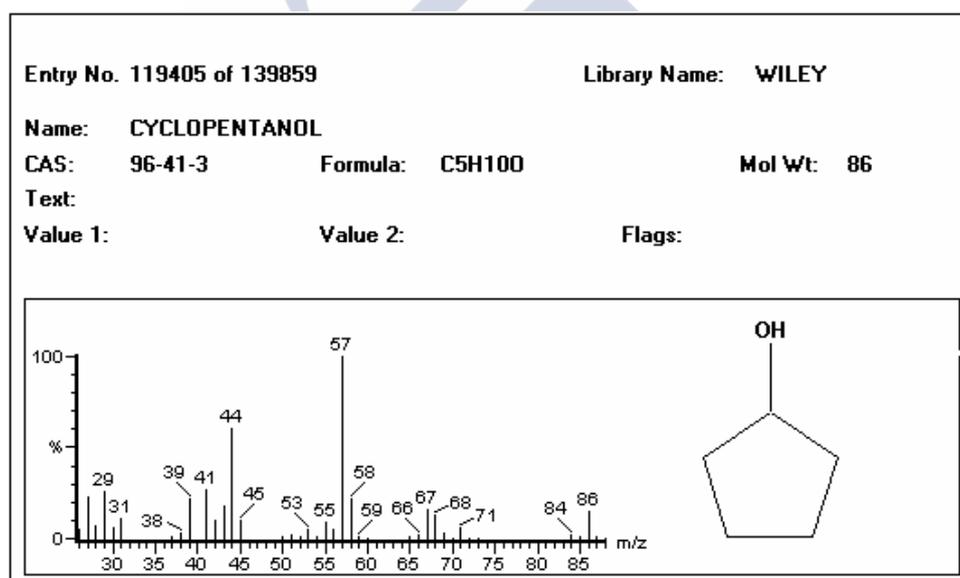


Figura 10.12. - Espectro de masas del Ciclopentanol.

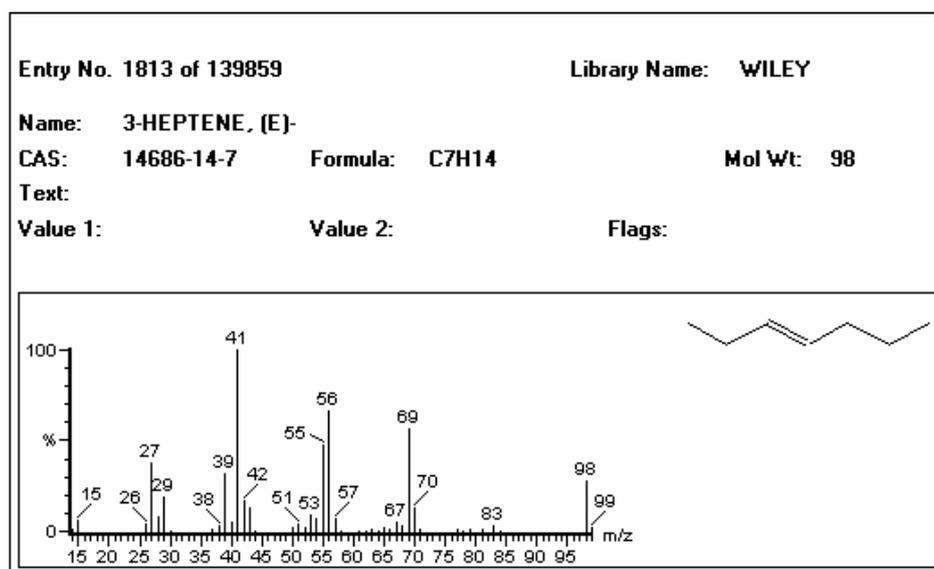


Figura 10.13. -Espectro de masas del 3-Heptene.

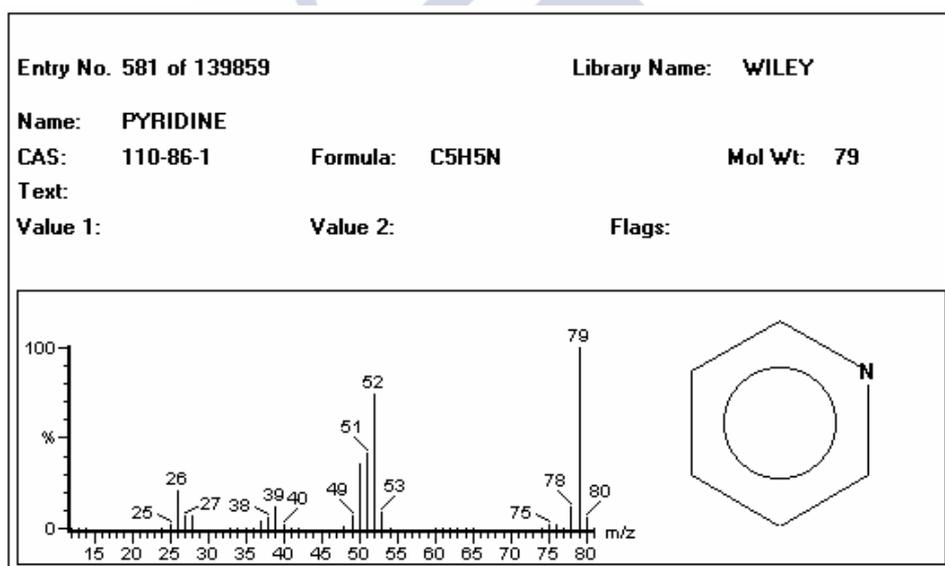


Figura 10.14. - Espectro de masas de la Piridina.

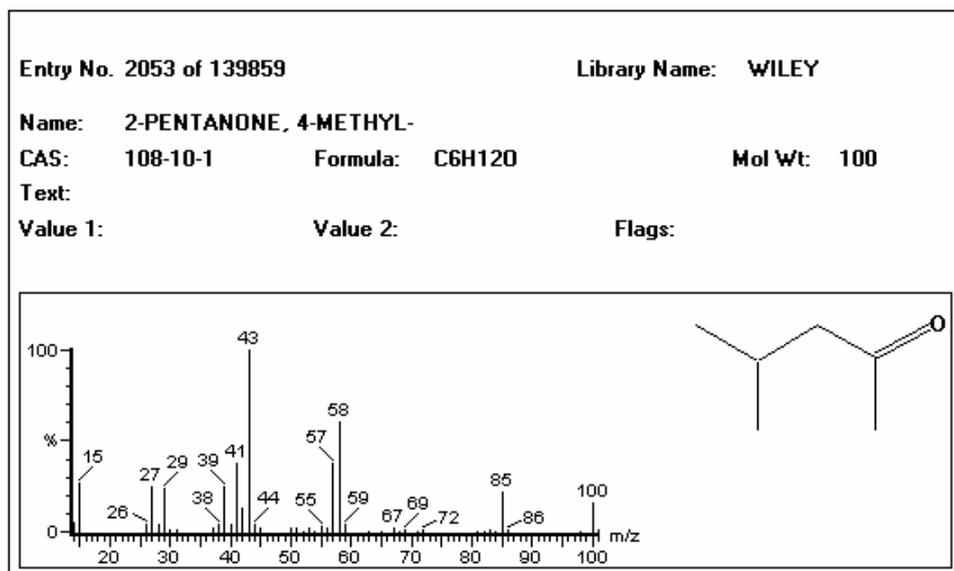


Figura 10.15. - Espectro de masas de la 4-Metil-2-pentanona.

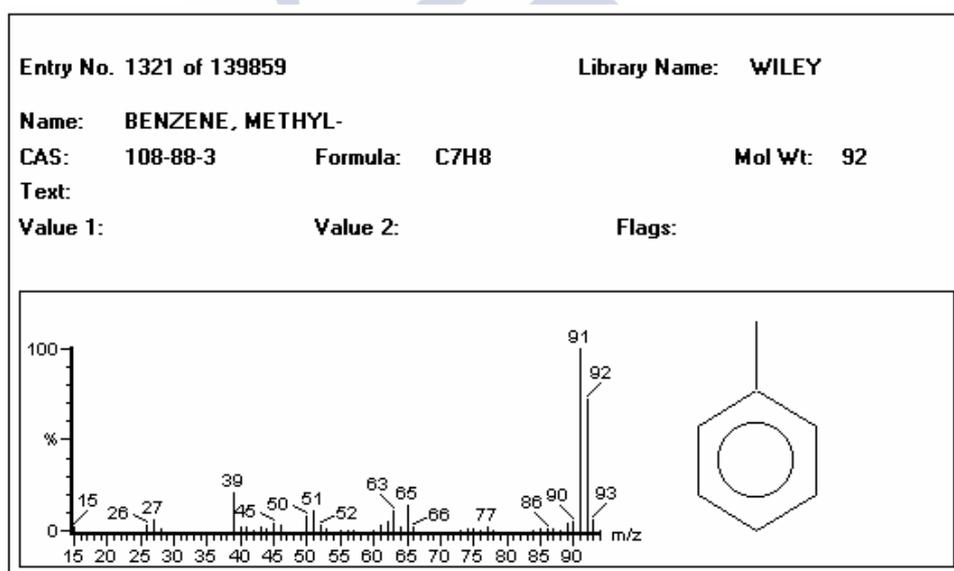


Figura 10.16. - Espectro de masas del Metilbenceno

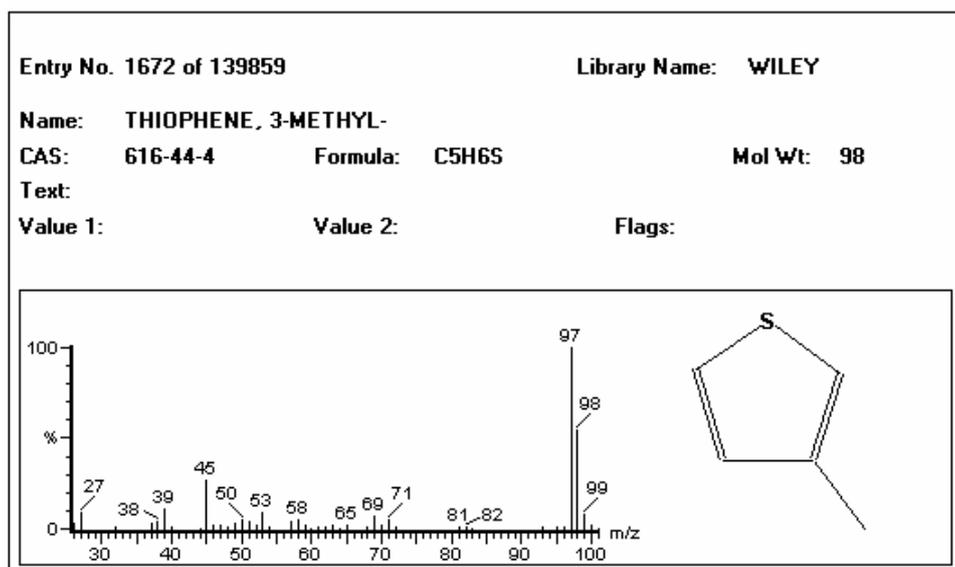


Figura 10.17. - Espectro de masas del 3-Metil tiofeno.

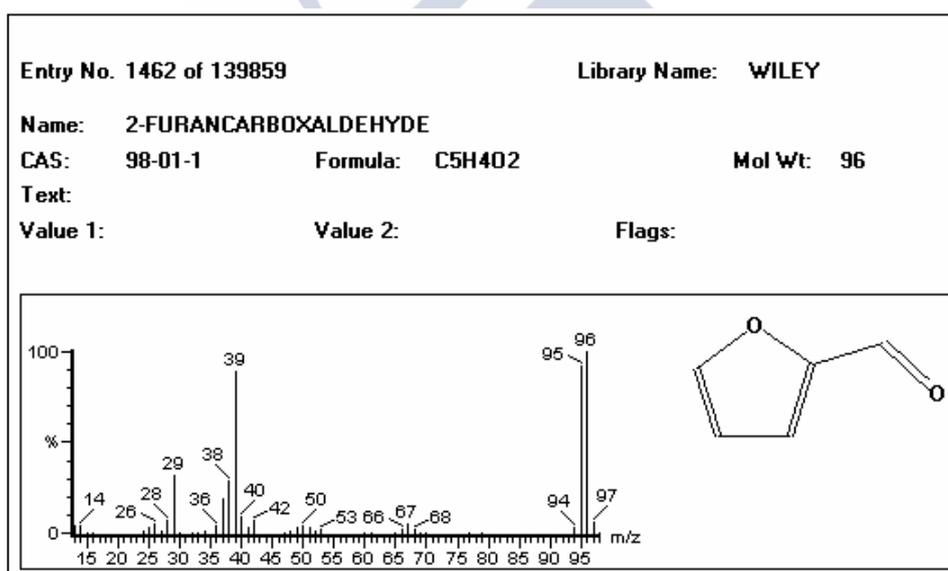


Figura 10.18. - Espectro de masas del 2-Furancarboxaldehido.

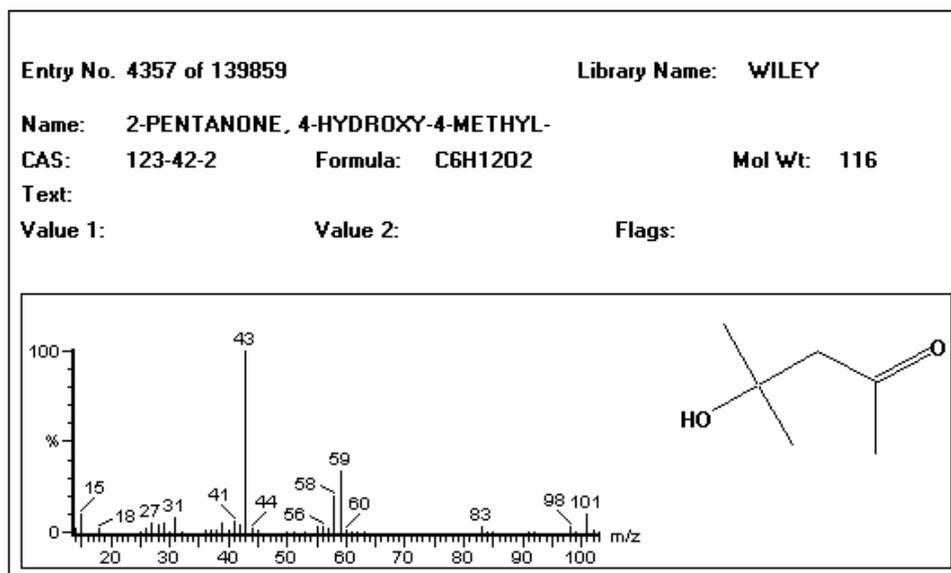


Figura 10.19. - Espectro de masas de la 4-Hidroxi-4-metil-2-pentanona

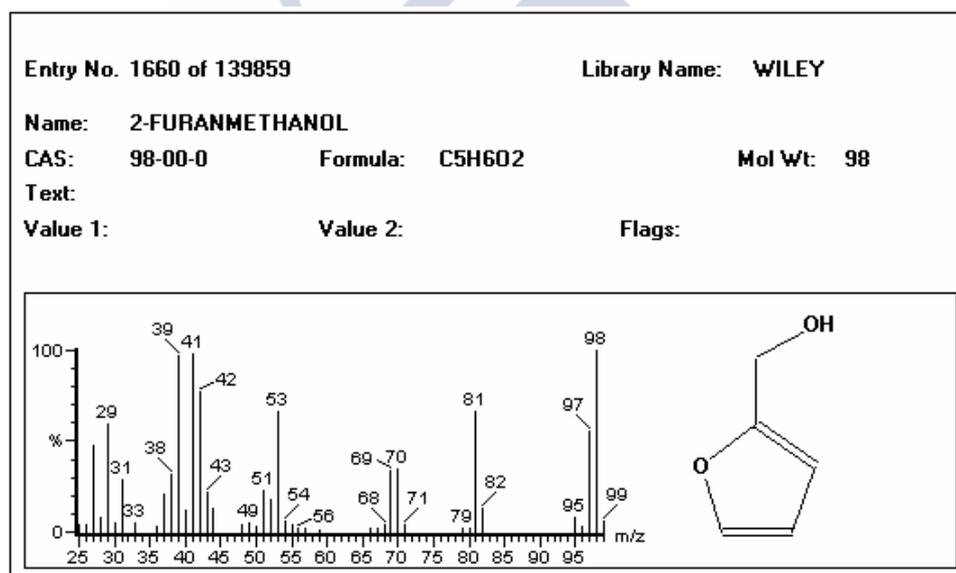


Figura 10.20. - Espectro de masas del 2-Furanmetanol.

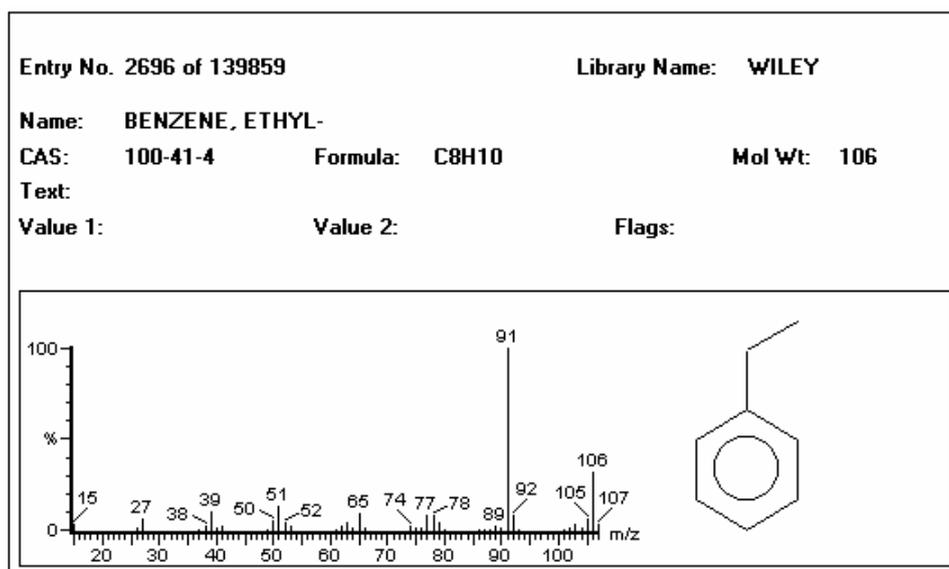


Figura 10.21. - Espectro de masas del Etilbenceno.

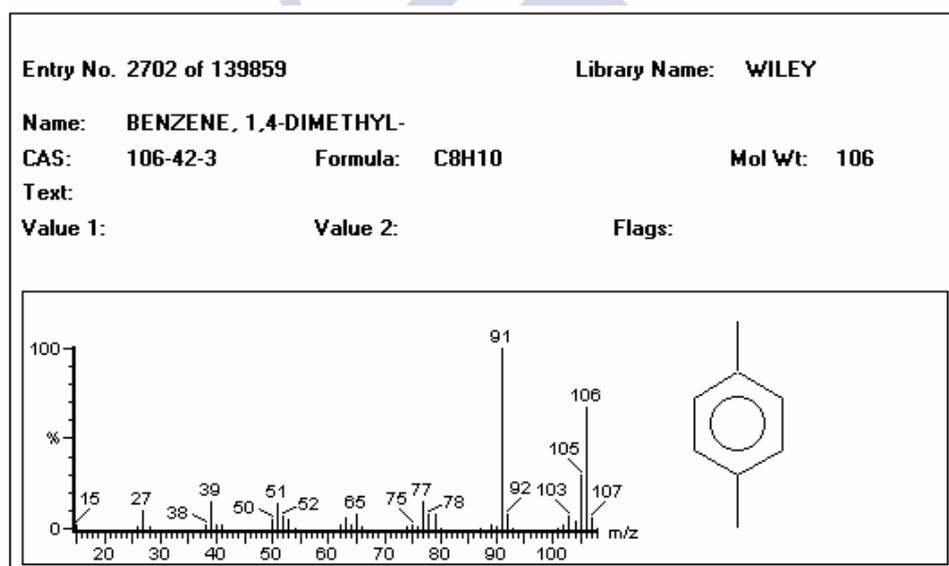


Figura 10.22. - Espectro de masas del 1,4- Dimetilbenceno.

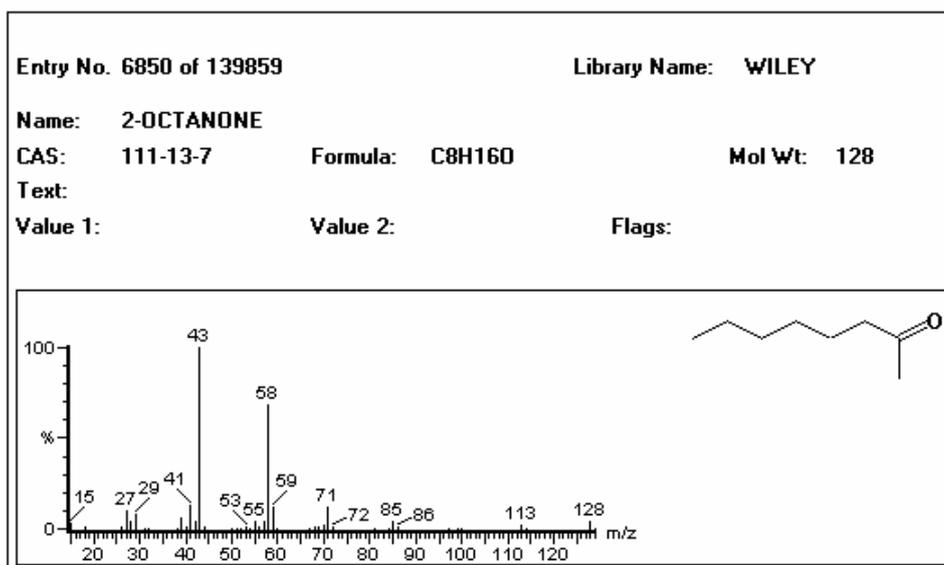


Figura 10.23. - Espectro de masas de la 2-Octanona.

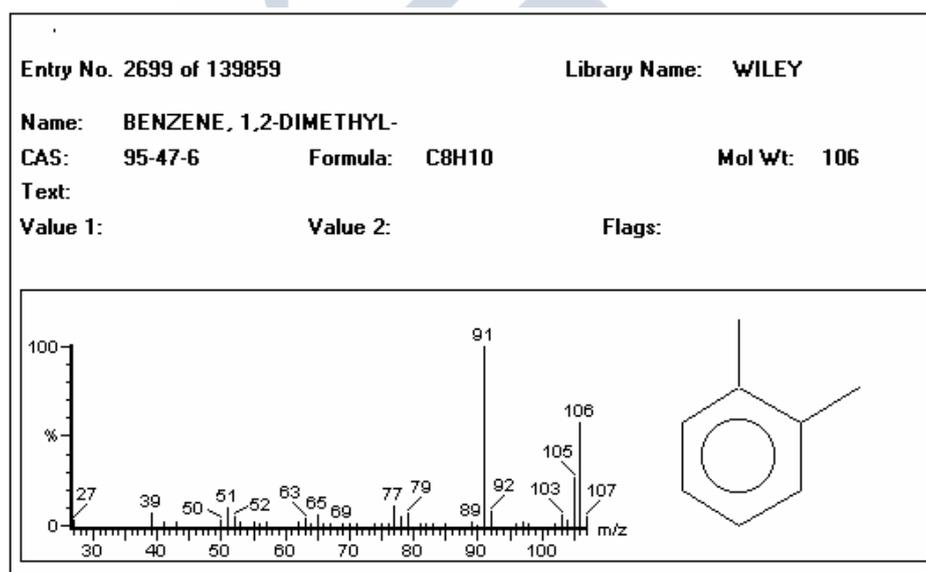


Figura 10.24. - Espectro de masas del 1,2-Dimetilbenceno

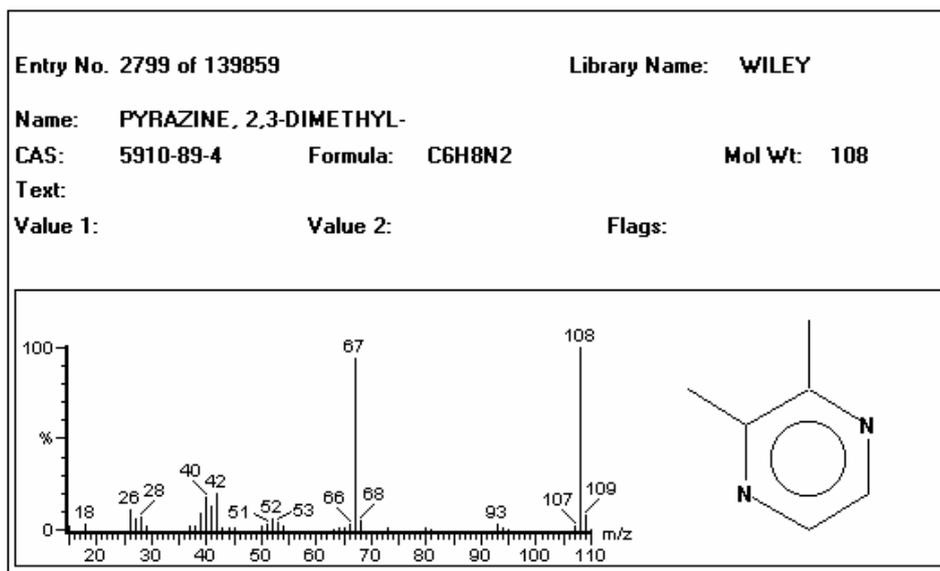


Figura 10.25. - Espectro de masas de la 2,3- Dimetil pirazina.

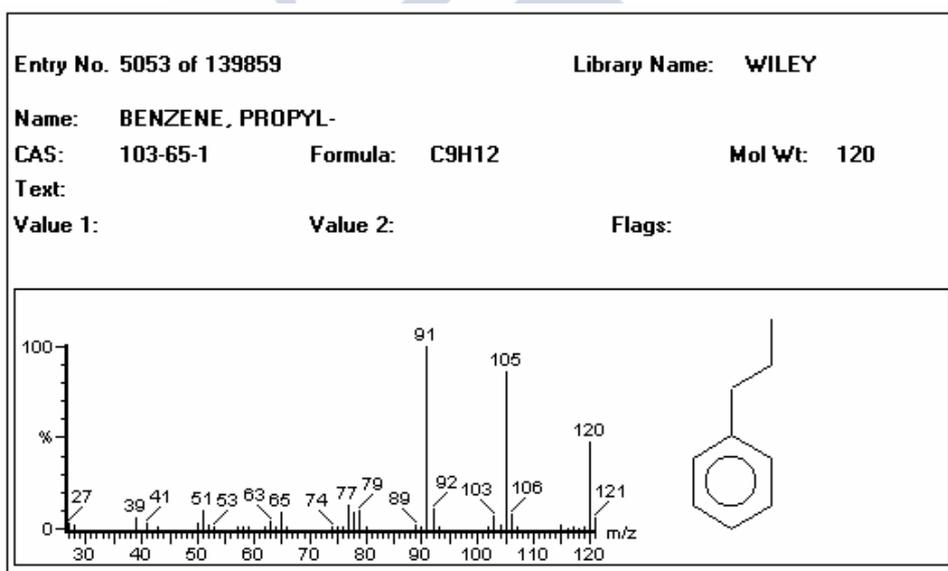


Figura 10.26. - Espectro de masas del Propilbenceno.

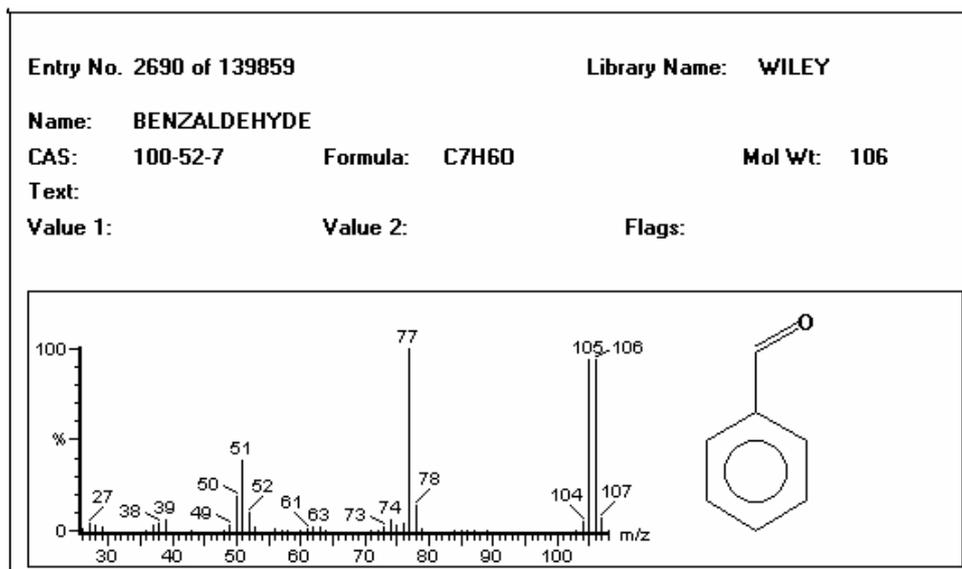


Figura 10.27. - Espectro de masas del Benzaldehido.

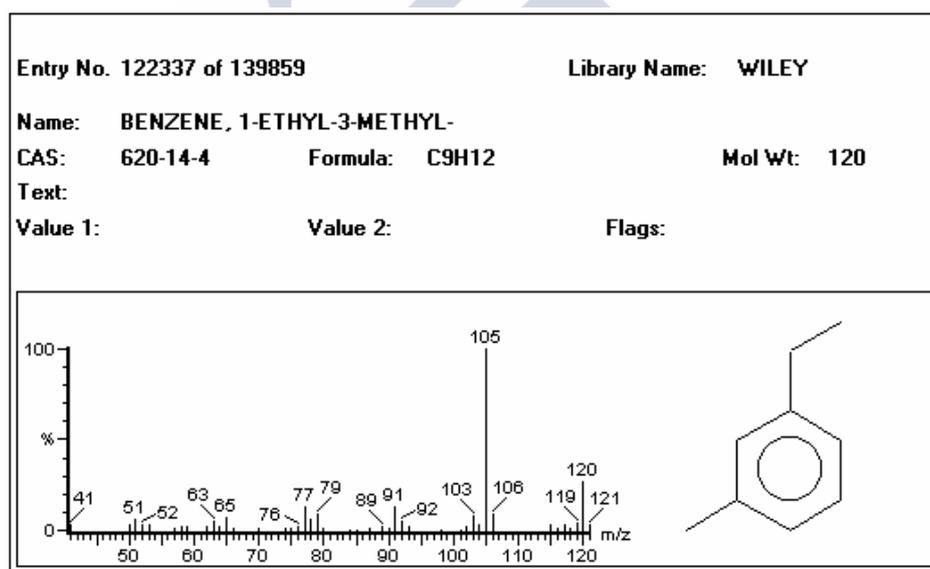


Figura 10.28. - Espectro de masas del 1-Etil-3-metilbenceno.

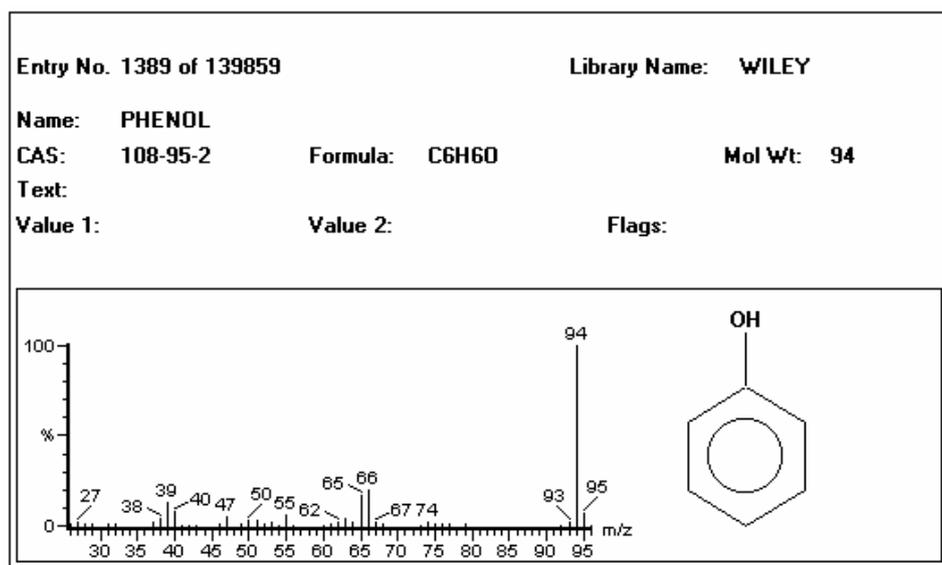


Figura 10.29. - Espectro de masas del Fenol.

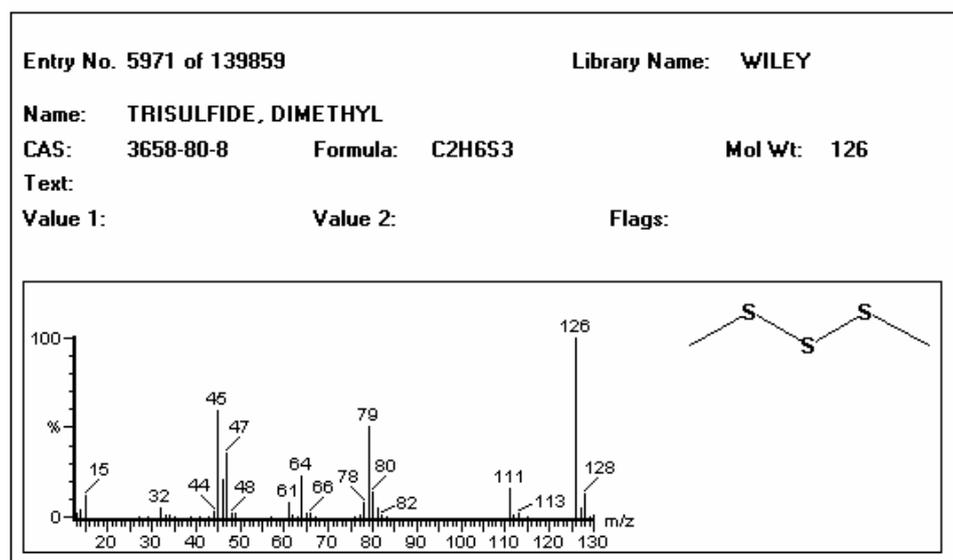


Figura 10.30. - Espectro de masas del Trisulfuro de dimetilo.

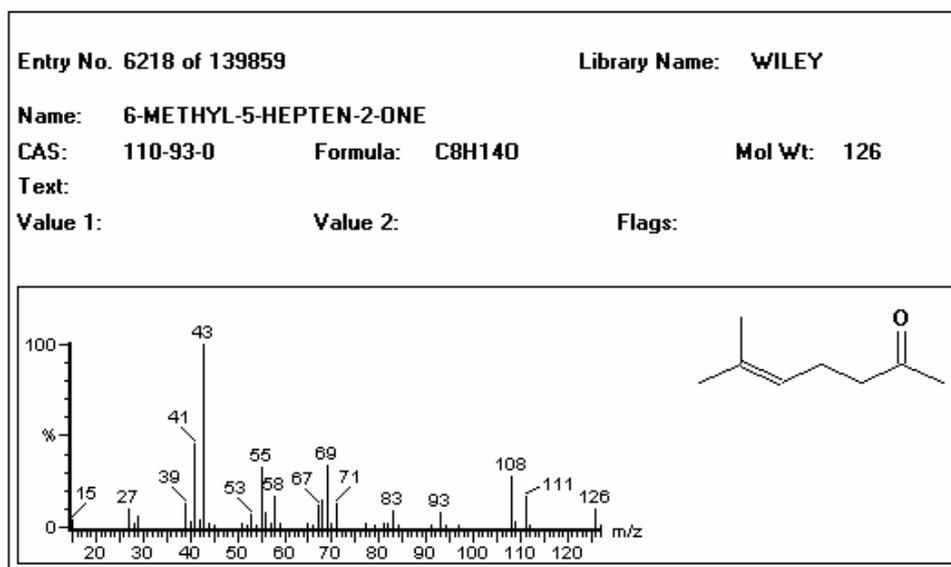


Figura 10.31. - Espectro de masas de la 6-Metil-5-hepten 2-ona.

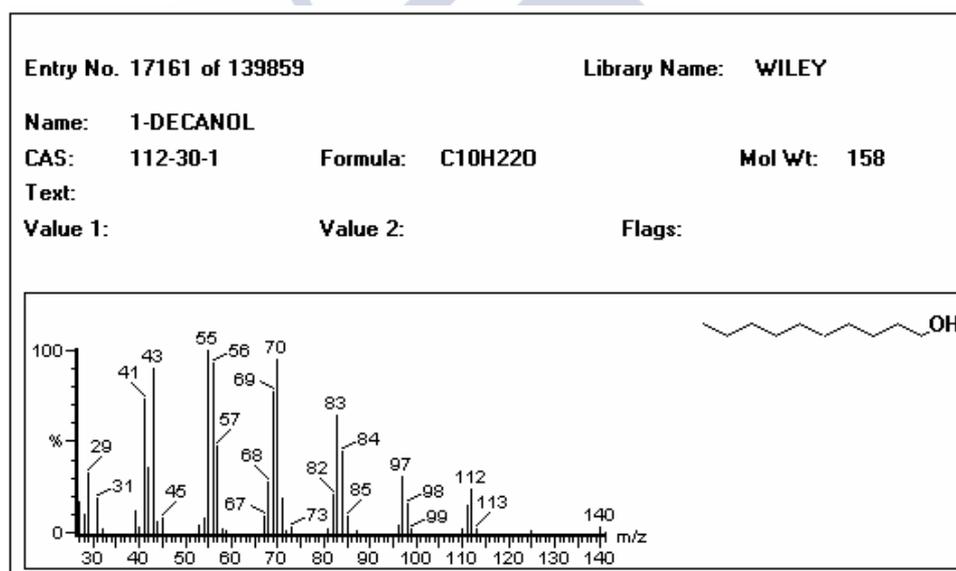


Figura 10.32. - Espectro de masas del 1-Decanol.

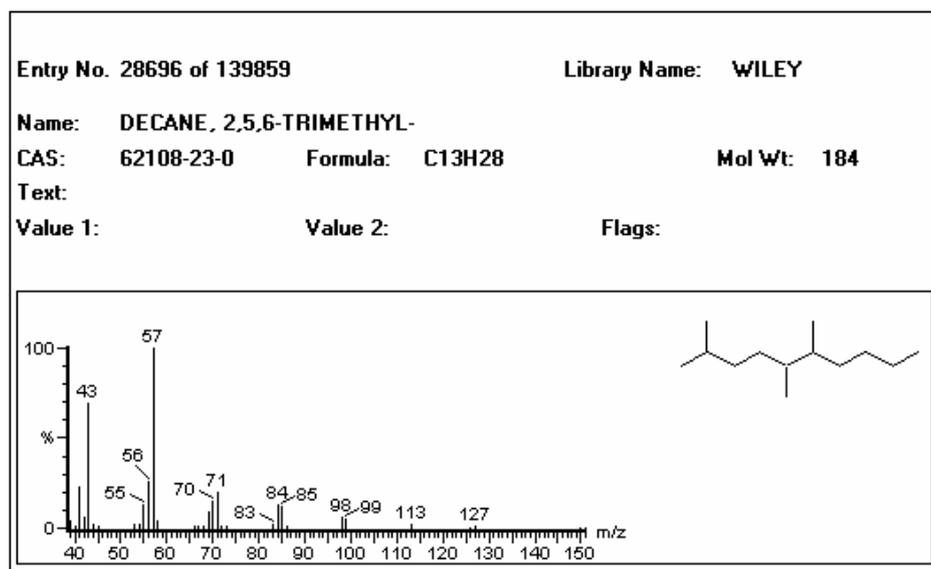


Figura 10.33. - Espectro de masas del 2,5,6-Trimetildecano

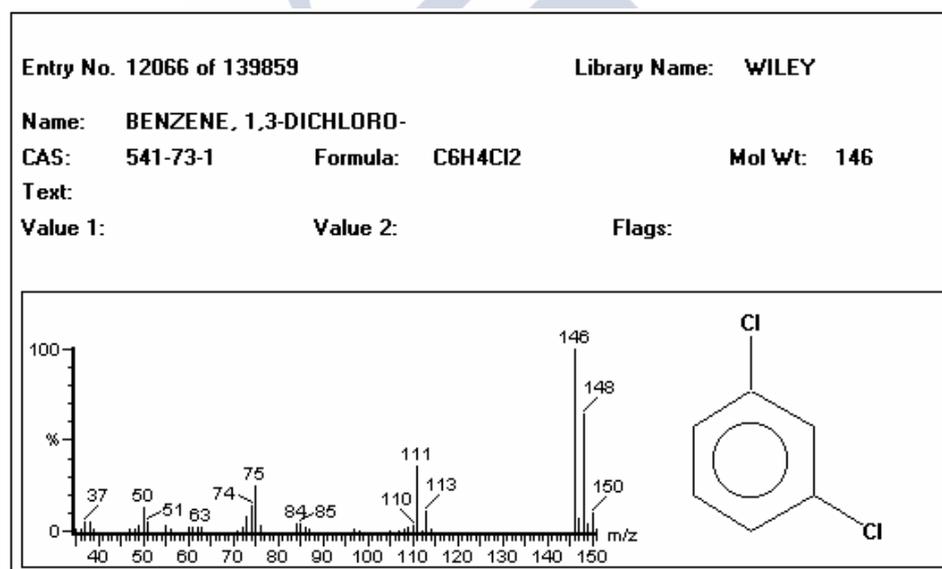


Figura 10.34. - Espectro de masas del 1,3-Diclorobenceno.

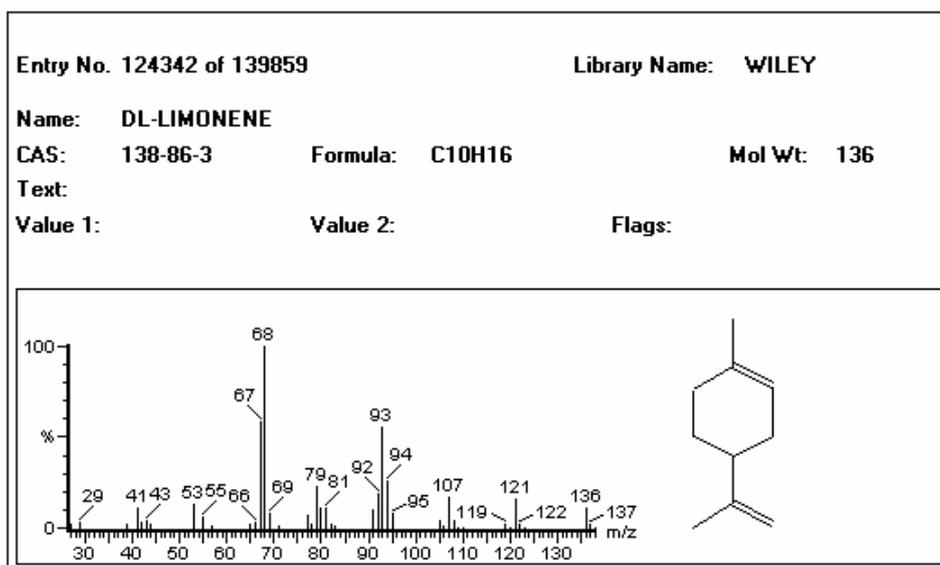


Figura 10.35. - Espectro de masas del Limoneno.

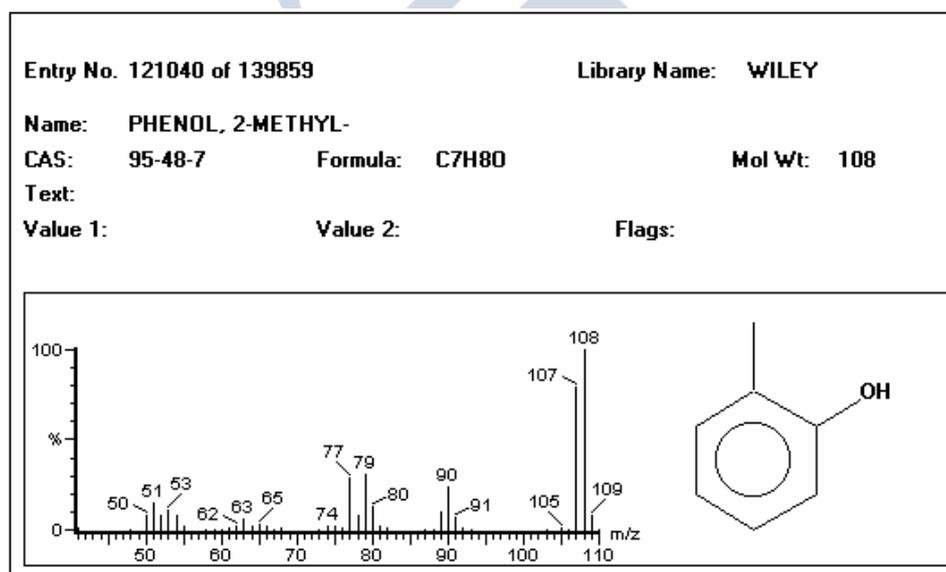


Figura 10.36. - Espectro de masas del 2-Metilfenol.

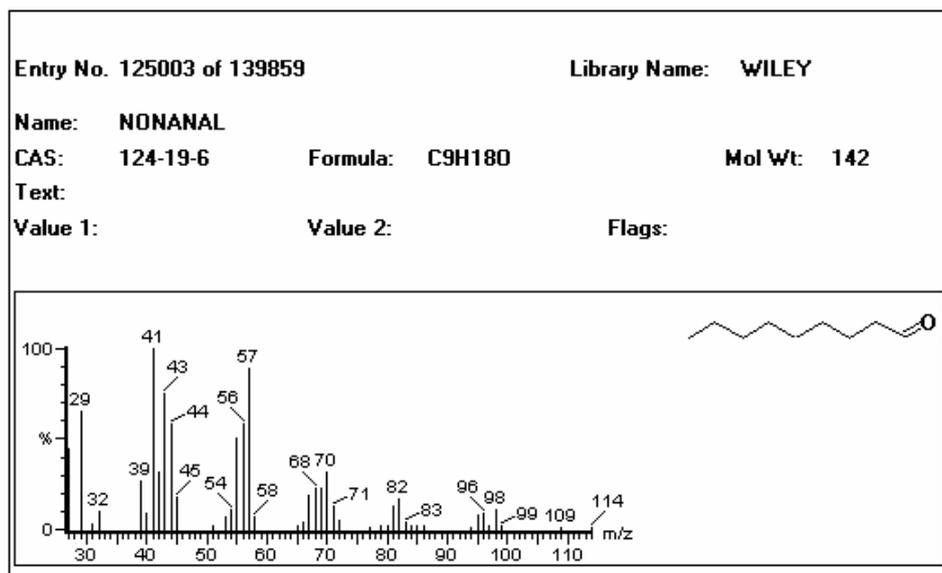


Figura 10.37. - Espectro de masas del Nonanal.

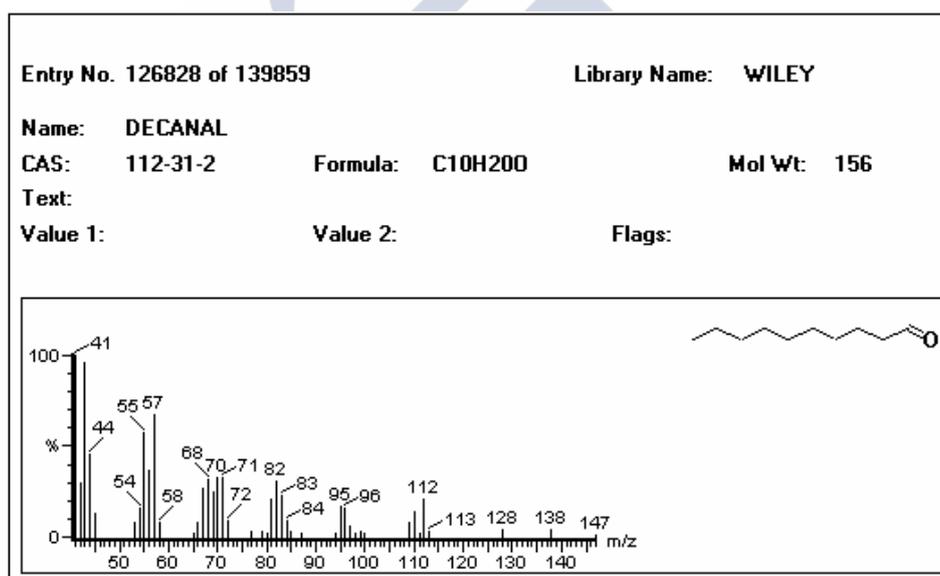


Figura 10.38. - Espectro de masas del Decanal.

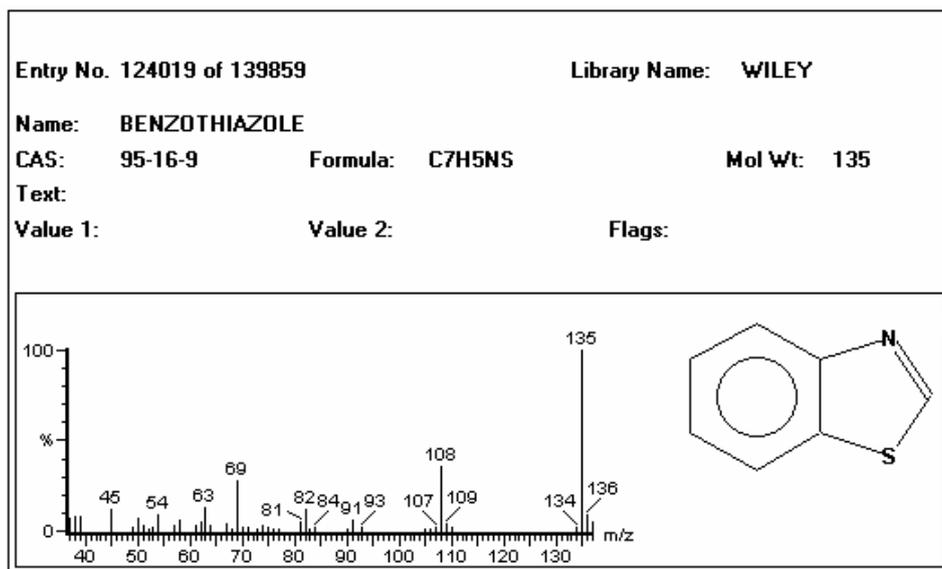


Figura 10.39. - Espectro de masas del Benzotiazol.

Las fotografías han sido tomadas de dos páginas de Internet:

http://www.oar.noaa.gov/spolite/archive/spot_urchin.html

http://www.marlin.ac.uk/PADI_Parliv.htm

