



## **MEMORIA DEL PROYECTO DE INNOVACIÓN Y MEJORA DOCENTE CURSO 2018-2019**

### **TITULO DEL PROYECTO:**

ELABORACIÓN DE UN PROTOCOLO DE DETERMINACIÓN DE MICRONUTRIENTES PARA SU IMPLEMENTACIÓN EN LA DOCENCIA PRÁCTICA

### **REFERENCIA:**

ID2018/169

### **COORDINADOR DEL PROYECTO:**

Montserrat Dueñas Patón

Facultad de Farmacia. Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología

### **MIEMBROS DEL EQUIPO DE TRABAJO:**

Susana González Manzano

Ignacio García Estévez

Facultad de Farmacia. Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología

**FINANCIACIÓN CONCEDIDA: 1275 €**

## ÍNDICE

1. Introducción .....	3
2. Objetivos del proyecto .....	3
3. Metodología de trabajo .....	4
4. Resultados del proyecto .....	8
5. Conclusiones .....	9

## **1. INTRODUCCIÓN**

El proyecto de innovación docente “Elaboración de un protocolo de determinación de micronutrientes para su implementación en la docencia práctica” se quiere introducir como una metodología analítica más novedosa en las clases prácticas de la asignatura de Nutrición y Bromatología, que se imparte en el grado de Farmacia, con la finalidad de eliminar alguna de las prácticas que se impartían actualmente, debido a que por los avances tecnológicos y/o de legislación se están quedando obsoletas.

Las clases prácticas son de enorme importancia, facilitan el desarrollo de destrezas a la vez que favorecen el conocimiento de los métodos propios de cada materia. Son imprescindibles para la adquisición de determinadas competencias, sobre todo las que desarrollan habilidades técnicas, y proporcionan una visión global de la práctica profesional. En las clases prácticas el alumno participa activamente, este hecho conducirá a un aprendizaje más efectivo.

El conocimiento de las distintas metodologías analíticas para la determinación de los distintos componentes de los alimentos es necesario para adquirir algunas de las competencias específicas de los graduados en Farmacia. Entre ellas se encuentra “conocer los principios y procedimientos para la determinación analítica de compuestos presentes en alimentos”. Por otra parte, conocer la composición nutricional, en este caso la identificación y cuantificación de los distintos carotenos, de un alimento es fundamental para valorar una dieta, que es uno de los objetivos a conseguir por el estudiante en la asignatura de Nutrición y Bromatología. Por lo tanto, con la incorporación de esta práctica en la docencia de esta asignatura, se pretende que el estudiante adquiera habilidades técnicas, esto se llevara a cabo mediante el uso de distintos equipos y aparatos para realizar determinaciones analíticas.

## **2. OBJETIVOS DEL PROYECTO**

Los objetivos planteados en este proyecto son los siguientes:

- Diseñar y optimizar un protocolo para la determinación de micronutrientes, en concreto los carotenos, en alimentos de origen vegetal.
- Proporcionar al estudiante conocimientos sobre el empleo de diferentes técnicas analíticas de extracción, separación y cuantificación de componentes y/o nutrientes de alimentos.

- Analizar e interpretar los resultados obtenidos para fomentar una discusión crítica por parte de los alumnos.

Con este proyecto se pretende diseñar y optimizar el protocolo para una práctica que permita enseñar a los estudiantes a conocer distintas técnicas cromatográficas, aplicadas en el proceso de separación de los distintos tipos de carotenos, esto ayudará al estudiante a mejorar el conocimiento de dichas técnicas y reflexionar sobre cuál es la más apropiada para la determinación cualitativa y/o cuantitativa de estos micronutrientes. Asimismo, se quiere lograr que los estudiantes conozcan los distintos tipos de carotenos presentes en diferentes alimentos de origen vegetal.

De esta forma se pretende facilitar la adquisición de competencias propias del Grado de Farmacia y correspondientes a la asignatura Nutrición y Bromatología, en concreto:

- Conocer técnicas generales del análisis de alimentos y de nutrientes específicos.
- Aplicar técnicas analíticas que permitan conocer la composición y la calidad del alimento.

### 3. METODOLOGÍA DE TRABAJO

En este proyecto se va a realizar un protocolo para la determinación de carotenos. Estos compuestos son pigmentos que aportan colores con tonos amarillo-rojizos a muchas frutas y hortalizas, actúan como antioxidantes para nuestro organismo. Dentro del grupo de compuestos de los carotenos existen subgrupos ( $\beta$ -carotenos,  $\alpha$ -carotenos, licopeno, criptoxantina, etc.) entre los que destaca el  $\beta$ -caroteno, debido al importante papel que desempeña en la nutrición humana como precursor de la vitamina A. Esta vitamina es esencial para el funcionamiento correcto de distintos órganos y tejidos, así como para la reparación de los mismos.

Una vez concedida la ayuda, llevamos a cabo los siguientes pasos para elaborar el protocolo:

1. En una primera etapa se optimizó el proceso de **extracción de los pigmentos de diferentes alimentos vegetales** (zanahoria, tomate, pimiento y espinacas). Para ello se pesó 10 gramos de zanahoria, tomate y pimiento y 1 gramo de espinaca, y se extrajeron los pigmentos con 25 ml de etanol al 95 % en caliente, usando una placa calefactora con agitador. Transcurridos 15 minutos se filtró con un papel de filtro y se procedió a una

segunda extracción con otros 25 ml de etanol al 95 %, con el fin de extraer todos los pigmentos, después de esta segunda extracción, los productos vegetales quedaban incoloros. Los extractos de ambas extracciones se juntaron para la posterior separación.



1. Extracción con etanol al 95%



2. Filtrar el extracto



2. La siguiente etapa, después de obtener los extractos, se procedió a la **separación de los carotenos** de otros pigmentos presentes en estos alimentos vegetales, como las xantofilas, mediante una **extracción líquido-líquido**. Para ello, se añadió al extracto alcohólico, obtenido en el paso anterior, 9 ml de agua, para facilitar la extracción líquido-líquido y 25 ml de éter de petróleo. La separación de los carotenos de las xantofilas, se llevó a cabo en un embudo de decantación, se dejó en reposo para que se separaran las dos fases, en la superior se encontraban los carotenos (fase etérea) y en la inferior las xantofilas (fase etanólica). El proceso de separación con éter de petróleo se repitió otra vez más. Una vez obtenidas las fases etéreas con los carotenos, se juntaron y se evaporó el éter de petróleo en un rotavapor a una temperatura inferior a 40°C. Posteriormente, se disolvió el residuo en 2 ml de éter de petróleo.



3. Separación de carotenos de otros pigmentos



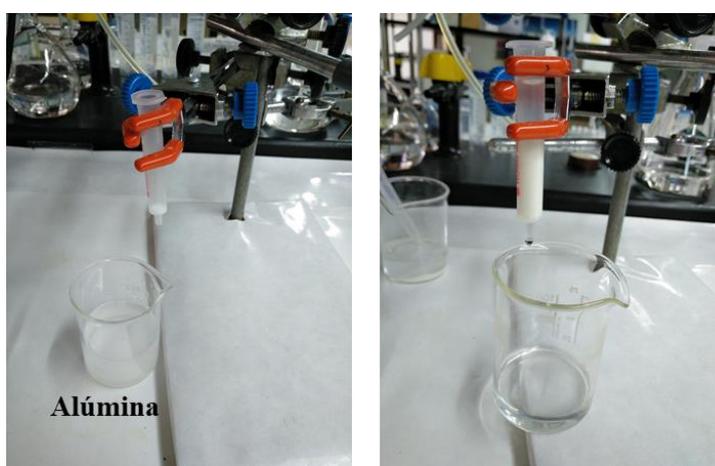
4. Evaporación del éter de petróleo



Extractos de carotenos de distintos alimentos vegetales

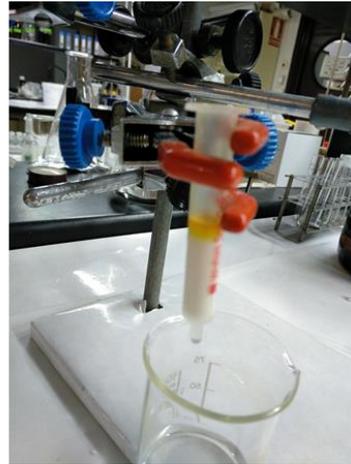
En esta etapa de separación de compuestos, los alumnos pueden distinguir, por medio de la coloración, la fase en la que se encuentran los carotenos y en la que se encuentran las xantofilas.

3. Una vez separados los carotenos se procedió a **purificar esta fracción**, empleando **cromatografía de adsorción**. Para ello se usaron cartuchos con alúmina como fase estacionaria y como fase móvil una mezcla de disolventes orgánicos que permita la mejor separación posible. Para ello, previamente se acondicionó la alúmina con 2 ml de metanol, se procedió al rellenado del cartucho, donde tendrá lugar la purificación y posteriormente se añadió con 2 ml de una mezcla de éter de petróleo-acetona (95:5).



5. Acondicionamiento de la alúmina y rellenado del cartucho

Una vez acondicionado el cartucho se depositaron 100  $\mu$ l o 200  $\mu$ l de extracto (dependiendo de la matriz alimentaria) y se utilizó como fase móvil una mezcla de éter de petróleo-acetona (95:5, v/v). Esta etapa permitió purificar la fracción de carotenos de otros pigmentos, como el licopeno y clorofilas, presentes en los alimentos vegetales estudiados.



6. Depositar el extracto de carotenos en el cartucho

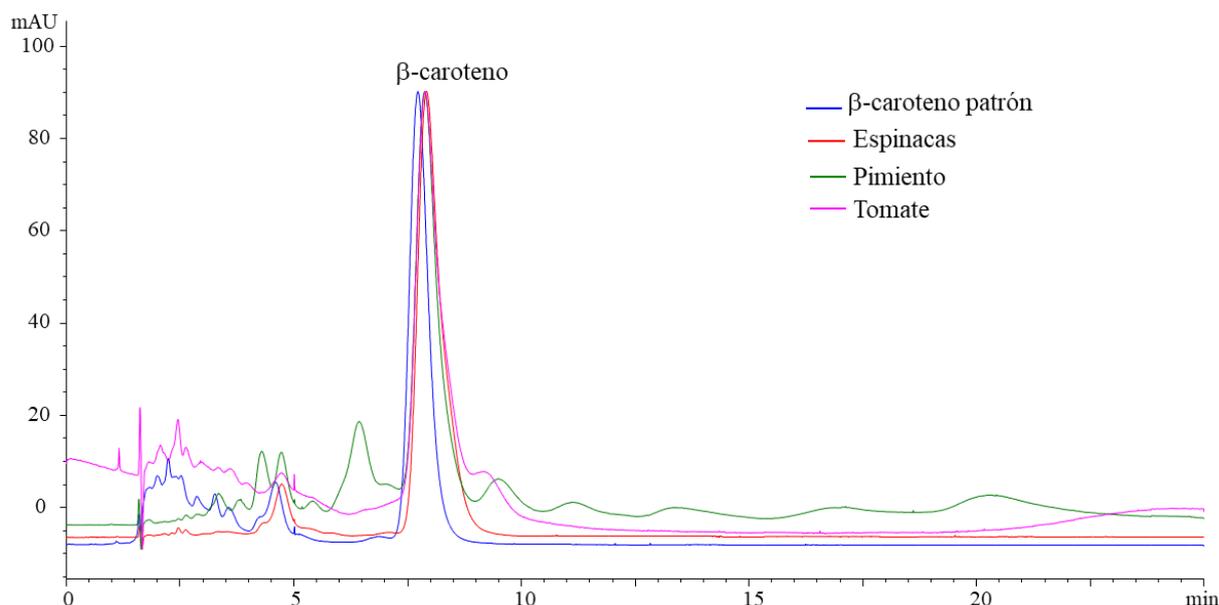


7. Elución de carotenos con éter de petróleo/acetona (95:5, v/v)

Con esta etapa, se pretende que el alumno conozca la extracción en fase sólida que es la técnica usual en el tratamiento y concentración de muestras antes de su análisis, y no se usa en ninguna otra práctica. Por otra parte, verán el distinto orden de elución de los carotenos y del resto de pigmentos presentes en esta fracción.

4. Finalmente, se optimizó un **método de análisis de carotenos por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) en fase reversa**. Para ello se utilizó una columna C30 (150 x 4.6 mm I.D, 3 $\mu$ m tamaño de partícula). Las fases móviles utilizadas fueron metanol (eluyente A) y metil-tert-butil éter (eluyente B) y agua (eluyente C). El flujo fue de 1ml min<sup>-1</sup>. El gradiente de elución establecido fue de 90% A+5% B+ 5% C, durante 5 minutos, 95% A+5% B; durante 5 minutos, 89% A +11 %B, durante 6 minutos, 75% A +25% B durante 6 minutos 40% A + 60% B, durante 3 minutos, 15 %A + 85% B, durante 3 minutos seguido del reequilibrado de la columna. La cuantificación se realizará a partir

de una recta de calibrado externa del  $\beta$ -caroteno estándar, inyectado en las mismas condiciones que los extractos de los alimentos.



**Figura 1.** Cromatograma a 450 nm del  $\beta$ -caroteno patrón y las muestras analizadas.

Con el análisis, mediante HPLC del  $\beta$ -caroteno de los distintos alimentos, se pretende que el alumno aprenda a interpretar un cromatograma, es decir que sepan identificar qué pico de los que aparecen en el cromatograma es el  $\beta$ -caroteno. Esto lo llevan a cabo por comparación, del tiempo de retención, con el patrón. A su vez, también pretendemos que aprendan a cuantificar este caroteno de todas las muestras estudiadas, utilizando para ello la recta de calibrado del patrón (Figura 1).

### 3. RESULTADOS DEL PROYECTO

Se ha optimizado el protocolo de extracción, separación y cuantificación de la fracción de carotenos en distintos alimentos de origen vegetal, dicha práctica se implantará en el curso 2019/2020 en la asignatura de Nutrición y Bromatología del Grado de Farmacia, cuya docencia práctica se imparte en el primer cuatrimestre, durante los meses de septiembre, octubre y noviembre.

Con este protocolo optimizado pretendemos que el alumno conozca dos técnicas analíticas habituales en laboratorios de control de calidad y análisis de alimentos, con la finalidad de que puedan distinguir entre una determinación cualitativa y cuantitativa.

También podrán comparar los fundamentos de ambas técnicas para finalmente concluir cuales son las diferencias, ventajas e inconvenientes de usar dichas técnicas.

Por lo tanto, con la incorporación de esta práctica en la docencia de esta asignatura, se pretende que el estudiante adquiera habilidades técnicas, esto se llevará a cabo mediante el uso de distintos equipos y aparatos para realizar determinaciones analíticas.

La implementación de la práctica se realizará el siguiente curso académico 2019/2020, y tendrá el enfoque adecuado para propiciar que los alumnos se cuestionen los resultados experimentales obtenidos en el laboratorio. El profesor debe ser capaz de propiciar un debate que haga pensar a los alumnos.

#### **4. CONCLUSIONES**

Se ha elaborado un protocolo de extracción de carotenos de distintos alimentos de origen vegetal, así como su separación de otros pigmentos presentes en estos alimentos vegetales, mediante una extracción líquido-líquido. Por último, este protocolo también incluye un método de purificación de la fracción de carotenos mediante cromatografía de adsorción con un cartucho utilizando como fase estacionaria alúmina y un método de análisis cuantitativo de  $\beta$ -caroteno por HPLC para determinar la concentración de este caroteno en los distintos alimentos vegetales empleados.

Por tanto, se han logrado los objetivos planificados en el proyecto. Por lo que en el curso 2019/2020 se implantará esta nueva práctica en la asignatura de Nutrición y Bromatología del Grado de Farmacia.