



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

Tesis para obtener el grado académico de **Magíster en Ingeniería Química**

**“Obtención de fosfolípidos purificados a partir de
residuos del desgomado de la industria aceitera,
para ser utilizado como adyuvante en vacunas”**

Tesista: Ing. Rossi Valentina

Directora de Tesis: Dra. Pisarello Milesi, Ma. Laura

Codirector de Tesis: Dr. Querini, Carlos Alberto

Lugar: Instituto de Investigaciones en Catálisis y Petroquímica "Ing. Jose Miguel Parera" (INCAPE) - Dependencia CONICET – Universidad Nacional del Litoral (UNL)

Santa Fe, 9 de noviembre del 2024

Agradecimientos

Agradezco a todas las personas que hicieron posible la realización de este trabajo. En primer lugar, quiero expresar mi agradecimiento a mi directora de tesis, Dra. Ma. Laura Pisarello, por su orientación, paciencia y sabiduría en cada etapa de esta investigación. Sus comentarios y sugerencias fueron invaluable para el éxito de este trabajo.

También agradezco a mi codirector de tesis, Dr. Carlos Alberto Querini, por sus valiosas contribuciones y comentarios a lo largo de este proceso.

Agradezco a mis colegas y amigos del Laboratorio 60, en especial a la Dra. Maira Alejandra Maquirriain, por su apoyo constante, por ser mi inspiración y por compartir sus ideas y pensamientos conmigo.

Finalmente, quisiera agradecer a mi familia por su amor, apoyo y comprensión durante mi tiempo en la universidad.

Sin el apoyo y la ayuda de todas estas personas, este trabajo no habría sido posible. Les agradezco de corazón.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	3
RESUMEN.....	5
1. INTRODUCCIÓN.....	8
1.1. Obtención del residuo de desgomado del aceite.....	8
1.2. Características de las “gomas”	12
1.3. Aprovechamiento de los Fosfolípidos.....	18
1.4. Referencias.....	22
2. METODOLOGÍA.....	25
2.1. Introducción.....	25
2.2. Materias Primas y reactivos.....	25
2.3. Experiencias de Extracción.....	26
2.3.1. Etapa de extracción.....	26
2.3.2. Separación y secado.....	27
2.3.3. Experiencias con extracciones sucesivas.....	28
2.4. Caracterización.....	28
2.4.1. Materia Prima.....	28
2.4.2. Producto.....	29
2.5. Referencias.....	36
3. PUESTA A PUNTO DEL MÉTODO DE CROMATOGRAFÍA DE CAPA DELGADA.....	38
3.1. Introducción.....	38
3.2. Validación de la metodología AOCS.....	39
3.3. Efecto de la composición de la fase móvil.....	41
3.4. Efecto de la condición ambiente y el manipuleo en la composición de la fase móvil.....	47
3.5. Efecto del volumen de fase móvil.....	48
3.6. Conclusiones.....	49
3.7. Referencias.....	50
4. PURIFICACIÓN DE FOSFATIDILCOLINA.....	52
4.1. Introducción.....	52
4.2. Metodología.....	53
4.3. Resultados y Discusión	53
4.3.1. Composición de la lecitina.....	53
4.3.2. Análisis de las experiencias de extracción.....	56
4.3.2.1 Extracciones acetona-acetona-alcohol.....	56
4.3.2.2 Extracciones alcohol-acetona-acetona.....	65
4.3.3. Extracción con etanol: efecto de la composición y la relación lecitina:alcohol.....	71
4.4. Balances de masa.....	75

4.5. Conclusiones.....	79
4.6. Referencias.....	81
5. EMPLEO DE PC CONCENTRADO EN DESARROLLO DE VACUNAS.....	83
5.1. Trabajo interdisciplinario realizado.....	83
6. CONCLUSIONES GENERALES.....	87
6.1. Adopción de la técnica a utilizar.....	87
6.2. Experiencias de extracción.....	88
6.3. Balances de masa.....	88
6.4. Empleo de PC concentrado en desarrollo de vacunas.....	88
7. ACTIVIDADES FUTURAS.....	90
Anexo 1: Fósforo (g fósforo/100 g muestra) - AOCS Ca 12-55.....	93
Procedimiento.....	93
Preparación de soluciones.....	94
Anexo 2: Material Insoluble en Acetona - AOCS Ja 4-46.....	95
Definición.....	95
Alcance.....	95
Equipamiento.....	95
Reactivos.....	95
Preparación de la muestra.....	96
Procedimiento.....	96
Cálculos.....	97
Reproducibilidad.....	97
Anexo 3: Contenido de humedad(g agua/100 g muestra) - AOCS Ja 2-46.....	98
Procedimiento.....	98
Cálculo.....	98
Anexo 4: Fundamentos de la cromatografía de capa delgada.....	100

RESUMEN

El complejo oleaginoso argentino, que abarca desde la producción de granos hasta su industrialización, permitiendo obtener aceites crudos, refinados, residuos de la industria aceitera procesados (pellets, lecitina, etc) y biodiésel, es uno de los más importantes del mundo, y uno de los motores de la economía del país. Las 10 plantas de procesamiento de soja más grandes del mundo se encuentran en Argentina.

En la industria aceitera, se procesan las semillas oleaginosas, principalmente soja, separando el aceite de las harinas. Dentro de las etapas de purificación del aceite, ya sea para uso alimenticio o para su uso en la producción de biocombustibles, se realiza la operación de desgomado, que tiene por objetivo reducir el contenido de fosfolípidos del aceite. Esta operación genera un residuo que representa un 5% del aceite tratado, es decir que, por cada tonelada de aceite tratado se generan 50 kg de este residuo. Para dar una idea de la magnitud de la situación, el polo aceitero de Rosario cuenta con una capacidad de molienda de 126.000 toneladas diarias, lo que genera aproximadamente unas 1100 ton/día de residuos del desgomado.

La denominación de “gomas” a dicho residuo refiere a su apariencia, ya que está formado por una fuerte emulsión de fosfolípidos, agua y aceite. Tradicionalmente, los complejos industriales de procesamiento de soja re-inyectaban en las harinas el residuo generado en esta operación. En la actualidad esta operación ya no es posible debido a que el poroto de soja, y por ende las harinas, han tenido una importante caída en el contenido proteico. Por lo tanto, ya no pueden diluirse y el residuo del desgomado no puede re-inyectarse en las harinas, por lo que surge la oportunidad de desarrollar nuevas aplicaciones fundamentalmente para dar valor a este subproducto.

Las “gomas” están constituidas aproximadamente por un 30% de aceite ocluido, 40% de fosfolípidos, 30% de agua y en menor medida de otros componentes como ser glicolípidos, azúcares complejos, etc. Entre los fosfolípidos que componen las gommas, se encuentran en mayor proporción la fosfatidilcolina (PC), la fosfatidiletanolamina (PE), el fosfatidilinositol (PI) y el ácido fosfatídico (PA).

En particular, la PC y la PE con una pureza del 60% aproximadamente, han sido ampliamente utilizados en la industria alimenticia como agentes estabilizantes, emulsionantes y humectantes. Además, la PC y la PE se utilizan en la industria farmacéutica y cosmética, con la consideración particular de que en estos casos se requiere el fosfolípido con un grado de pureza considerablemente mayor (superior al 80% de pureza).

Paralelamente, los fosfolípidos comerciales con alto grado de pureza, son utilizados en el desarrollo de nuevos medicamentos. Se conoce el uso de los mismos como adyuvantes tipo cajas lipídicas para vacunas, obteniéndose alta efectividad hacia el patógeno. Sin embargo, una gran desventaja es el alto costo que tienen los fosfolípidos disponibles comercialmente.

El **objetivo central** de esta tesis es desarrollar procesos para transformar los residuos del desgomado de aceites en productos de mayor valor. Particularmente, se quiere producir adyuvantes para vacunas a partir de fosfolípidos extraídos de un residuo de la industria aceitera. Esto traería aparejado importantes beneficios, como ser el agregado de valor a un residuo que se genera en grandes cantidades en la Argentina y particularmente en nuestra provincia, y una reducción significativa de los costos de producción de vacunas.

En este marco, el **objetivo central** que se plantea es desarrollar un proceso de purificación del residuo del desgomado del aceite para obtener fosfatidilcolina en alta concentración para ser usada en la industria farmacéutica-veterinaria, más específicamente, como adyuvantes para vacunas. Adicionalmente, como **objetivo secundario**, se propone la estandarización y puesta a punto de la técnica analítica para determinar cuantitativa y cualitativamente los fosfolípidos presentes en los residuos del desgomado de aceites.

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

El trabajo de esta tesis se centra en la purificación de la PC para uso como coadyuvante de vacunas veterinarias y como una alternativa al agregado de valor del residuo del desgomado de aceites. Es importante resaltar que se ha trabajado en el marco de la presente tesis, con investigadores de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la UNL, quienes utilizaron los fosfolípidos purificados en esta tesis, para la formulación de vacunas. Se incluyen en este trabajo, los resultados obtenidos en esta aplicación.

En este capítulo se presenta una breve revisión del estado del arte acerca de la purificación de la fosfatidilcolina.

1.1. Obtención del residuo de desgomado del aceite

El proceso de refinado del aceite tiene como fin mejorar la calidad para su uso alimenticio o como materia prima para la industria del biodiésel. Durante la extracción del aceite crudo por solventes o prensado, se arrastran compuestos diferentes a los triglicéridos, tales como ácidos grasos libres, fosfolípidos, esteroides, tocoferoles, resinas, glucósidos, carotenos, pigmentos, material mucilaginoso, trazas de metales y pesticidas. Así, el refinado tiene como finalidad eliminar componentes indeseables, tratando de preservar la calidad de los constituyentes esenciales, en este caso los triglicéridos [1-2].

El conjunto de operaciones de purificación del aceite recibe el nombre de refinamiento, y abarca las etapas de desgomado, neutralización, blanqueo, winterizado, y desodorización. Dentro de estas, nos centraremos en la operación de desgomado, la cual tiene por finalidad extraer los fosfolípidos del aceite, hasta niveles que en general son inferiores a 10 ppm de fósforo, tanto para aplicación en la producción de aceite comestible, como para la producción de biodiesel.

La eliminación de los fosfolípidos durante el proceso de refinación resulta esencial por varios motivos, entre los que se destacan los siguientes:

-
- Los fosfolípidos son compuestos altamente emulsionantes, lo que supone un aumento en las pérdidas por refinación.
 - Normalmente, están asociados a metales prooxidantes, principalmente hierro, que disminuye la estabilidad del producto y le confiere turbidez por aparición de precipitados. Si los fosfátidos permanecen durante la desodorización, el aceite adoptará un color más oscuro y tendrá malas características organolépticas y de estabilidad.
 - Causan decantación en los tanques de almacenamiento.
 - Forman espumas durante el calentamiento.

Las etapas del refinado en las cuales se eliminan los fosfolípidos se denominan “desgomado”. En una primera etapa se utiliza solo agua, y en la segunda se agrega agua con ácido. Ambas etapas son requeridas ya que los diferentes fosfolípidos contenidos en el aceite presentan características particulares que requieren de distintas condiciones para poder ser separados del aceite. Según la afinidad de los distintos fosfolípidos por el agua se los clasifica como “hidratables” y “no hidratables”. En el primer grupo (hidratables) se encuentran el fosfatidilinositol y la fosfatidilcolina, y en el segundo (no hidratables) el ácido fosfatídico y la fosfatidiletanolamina. Las características y comportamientos de los diferentes fosfolípidos serán descritos en el siguiente punto (1.2). En la Figura 1.1 se muestran dos de las alternativas de desgomado. En la primera (Fig. 1.1.A) se muestra el diagrama del desgomado acuoso, donde se extraen los fosfolípidos hidratables. El segundo diagrama (Fig. 1.1.B) muestra un proceso de desgomado especial donde se combina la etapa ácida y una etapa usando sólo agua, extrayendo así tanto fosfolípidos hidratables como no hidratables.

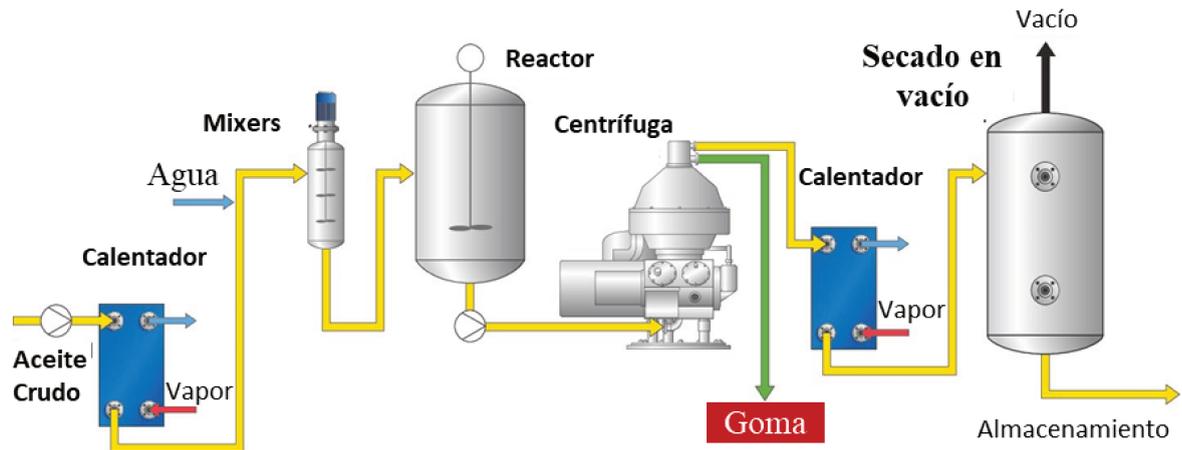


Figura 1.1.A: Proceso de desgomado acuoso

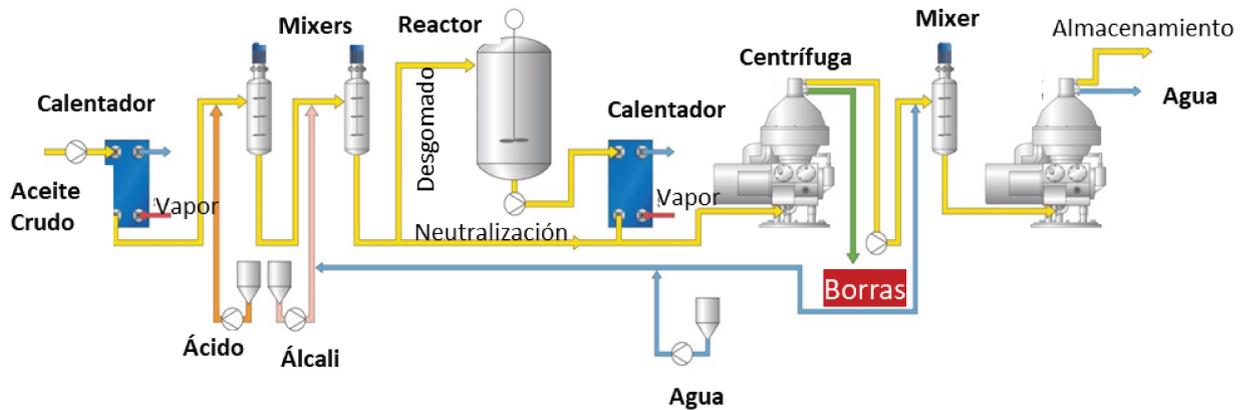


Figura 1.1.B: Proceso de desgomado especial ácido-acuoso

En el desgomado acuoso se remueven los denominados fosfolípidos hidratables. El aceite crudo pasa a través de un intercambiador de calor a placas, calefaccionado con vapor, hasta alcanzar 75-85 °C, y luego se le adiciona agua en porcentaje equivalente al contenido de fosfolípidos. Se realiza la mezcla rápida con mezcladores dinámicos, o con mezcladores estáticos, de menor eficiencia, que requieren un tiempo de hidratación mínimo de 30 minutos [2].

Luego, en el desgomado ácido (esquema no mostrado), el aceite a una temperatura entre 80 y 90 °C se mezcla con ácido fosfórico o cítrico, seguido por un tiempo de reacción de 5-20 minutos para hidrolizar los complejos de calcio y magnesio de los fosfolípidos no hidratables. Posteriormente, se mezcla con 2-5 % de agua a fin de

hidratar los compuestos formados, antes de enviarlo al separador centrífugo [2]. En la Fig. 1.1.B se muestra una variante, en la cual, mediante la adición de una pequeña cantidad de un ácido adecuado y lejía diluida a temperaturas cuidadosamente controladas, se logra la separación de las gomas hidratables y no hidratables de los aceites.

El residuo obtenido de la etapa de desgomado acuoso comúnmente se denomina “gomas” y el de la segunda (desgomado ácido) “borras”. La composición de ambas corrientes dependerá fuertemente del proceso de producción, pero a continuación se detallarán composiciones promedio de muestras analizadas en nuestro laboratorio, que coinciden con reportes de bibliografía. Las gomas contienen aproximadamente 40% agua, 38% de fosfolípidos, 20% de aceite y otras impurezas [3], y se encuentran formando una emulsión muy consistente [4]. En cuanto a las “borras” suelen tener una consistencia más fluida que las anteriores, por su menor contenido de fosfolípidos y su mayor contenido de agua (aproximadamente 50% de agua, 20% de aceite, 25% de fosfolípidos, 5% de jabones, y sales del ácido empleado en dicha etapa, típicamente fosfórico) [5-7].

Como se mencionó más arriba, el residuo del desgomado ya no puede utilizarse en su totalidad para ser reinyectado en las harinas de soja. Actualmente es usado en otras aplicaciones, principalmente para la producción de lecitina, que se obtiene luego de una etapa de secado de las gomas, con una composición aproximada es 60-65% de fosfolípidos totales, 30-35% de aceite, y 3% de impurezas. Este producto es empleado como emulsionante en la industria alimenticia, farmacéutica, cosmética, plásticos, pinturas, recubrimientos, pesticidas, petróleo, etc. Existen diferentes calidades de la lecitina. Por ejemplo, la lecitina grado alimentación animal tiene un precio aproximado de 600 U\$\$/ton. En el caso de las borras, la situación es menos favorable aún, dado el menor contenido graso y por tanto el menor valor de comercialización. Existe entonces un gran interés de la industria aceitera en desarrollar aplicaciones de estos subproductos

Es por ello que en esta tesis se propone desarrollar un proceso para el aprovechamiento de la fracción fosfolipídica presente en el residuo del desgomado, transformándola en productos de mayor valor.

1.2. Características de las “gomas”

El residuo del desgomado de aceites está compuesto principalmente por una mezcla compleja de fosfolípidos, triglicéridos, agua, y pequeñas cantidades de otros componentes como fitoglicolípidos, fitoesteroles, tocoferoles y ácidos grasos.

Los fosfolípidos son del tipo de los derivados del glicerol, cuyos grupos alcoholícos están esterificados por dos cadenas de ácidos grasos, y una tercera unión establecida por un grupo funcional con fósforo (éster orto-fosfórico), al cual se unen (formando un fosfo-diéster) bases nitrogenadas y otros grupos derivados de alcoholes.

En su mayoría, los fosfolípidos presentes en los aceites vegetales son la fosfatidil-colina (PC), la fosfatidil-etanolamina (PE), el fosfatidil-inositol (PI) y el ácido fosfatídico (AP).

En la Figura 1.2 se muestra la estructura de los principales fosfolípidos (Fig 1.2.A) presentes en los aceites vegetales, fitoglicolípidos (Fig 1.2.B), fitoesteroles (Fig 1.2.C), tocoferoles (Fig 1.2.D) y ácidos grasos (Fig 1.2.E).

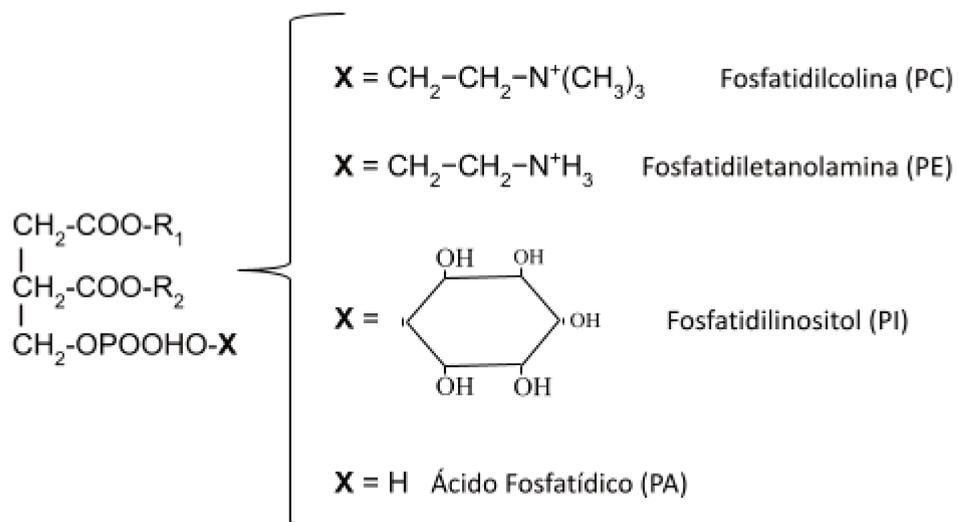


Figura 1.2.A. Estructura química de los principales fosfolípidos presentes en los aceites vegetales.

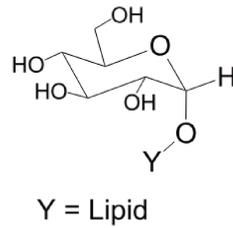


Figura 1.2.B. Estructura química de los fitoglicolípidos.

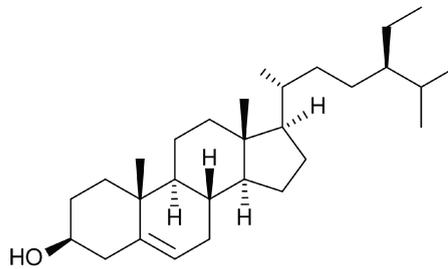


Figura 1.2.C. Estructura química de los fitoesteroles como el β -sitosterol.

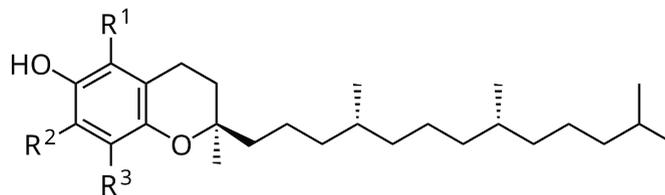


Figura 1.2.D. Estructura química de los tocoferoles.

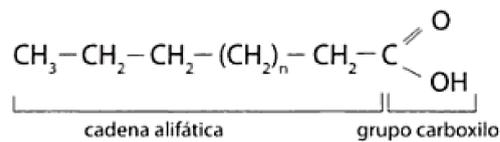


Figura 1.2.E. Estructura química de los ácidos grasos.

En menor medida también podemos encontrar las formas degradadas de los fosfolípidos, denominadas liso-fosfolípidos (Fig 1.2.F) [8]; el cual no es más que un fosfolípido que perdió una de las cadenas de ácido graso unido al glicerol.

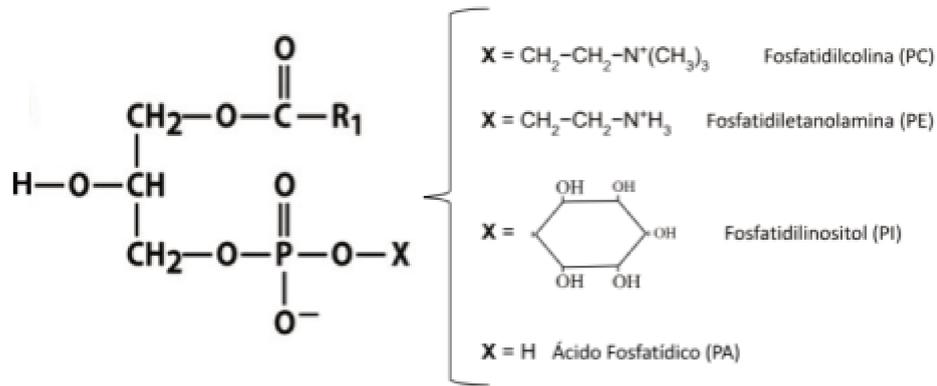


Figura 1.2.F. Estructura química de los liso-fosfolípidos.

En la Tabla 1.1 se muestra la distribución de los fosfolípidos en los aceites de soja [4]. La proporción de cada fosfolípido no sólo depende del tipo de cultivo sino también de la estación del año, zona de procedencia, el almacenamiento del grano, etc.

	Porcentaje (%)
<i>Fosfatidilcolina</i>	38-47
<i>Fosfatidiletanolamina</i>	21-25
<i>Fosfatidilinositol</i>	22-26
<i>Ácido Fosfatídico</i>	4-11
<i>Otros fosfolípidos</i>	5-8
Contenido total de fosfolípidos en el aceite	1,2-2,9

Tabla 1.1. Distribución porcentual de los fosfolípidos en los aceites de soja.

Los fosfolípidos en el residuo del desgomado se encuentran formando una interfase entre los componentes polares (agua) y no polares (aceite) del sistema, a través de estructuras bicapa y micelar dependiendo de la especie (Figura 1.3). Esta combinación de estructuras, sumado al poder de hidratación de los fosfolípidos, hacen que estas materias presenten una dificultad adicional para separar alguna fracción de los fosfolípidos que la conforman.

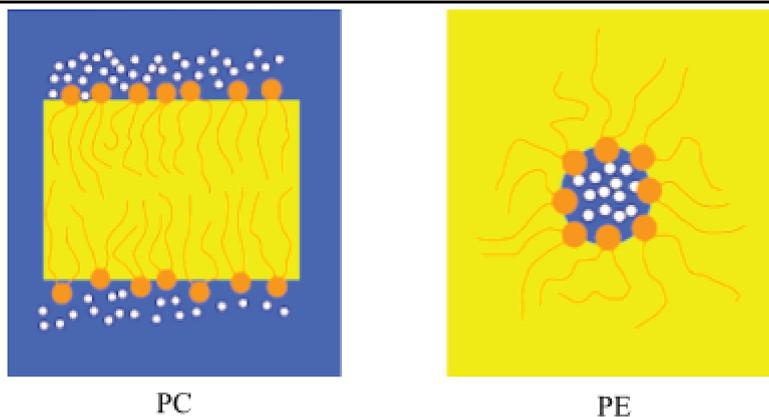


Figura 1.3. Estructura bicapa y micelar de las emulsiones agua:fosfolípido:aceite dependiendo de la especie.

El PI y la PC son normalmente designados como fosfolípidos “hidratables” debido a que poseen gran polaridad en el grupo fosfodiéster, y, por lo tanto, gran afinidad por el agua. En consecuencia, son los que se eliminan preferencialmente en la primera etapa del desgomado, obteniéndose el residuo denominado “gomas”. Por otro lado, el PA y la PE son definidos como fosfolípidos “no hidratables”, extrayéndose en la segunda etapa del desgomado, es decir en las “borras”.

La PE presenta un grupo amino y fosfato. A pH neutro se protona el primero y el segundo disocia, presentando una estructura quelante como la que se muestra en la Figura 1.4. El oxígeno negativo del fosfato se aproxima al nitrógeno positivo formando un anillo de 6 miembros, haciendo que el momento dipolar de la molécula se vuelva bastante pequeño. Esto hace que sea poco hidratable y tenga un coeficiente de reparto pequeño entre el agua y el aceite, disolviéndose preferentemente en este último. Por lo tanto, la eliminación de este fosfolípido con el desgomado acuoso sólo es parcial. Esto explica el hecho de que tengamos su presencia en las “gomas” a pesar de ser considerado un fosfolípido no hidratable [9].

El PA posee dos grupos hidroxilos que pueden disociarse. El valor de pKa de la primera disociación es de aproximadamente 2,7–3,8, y el de la segunda disociación está en el rango 7,9–8,7 [10]. Durante el desgomado con agua del aceite vegetal crudo, algo de PA es extraído como una mono-sal de potasio, dado que el potasio está débilmente ligado al PA disociado, que es la forma en la cual se encuentra en las

gomas. Sin embargo, cuando el PA está presente como sal de calcio o magnesio, forma un fosfátido no hidratable. Todos estos cationes se encuentran en forma natural en los aceites crudos [9].

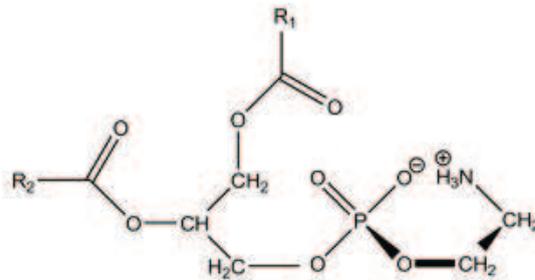


Figura 1.4. Estructura química de la fosfatidiletanolamina en los aceites vegetales sin desgomar, donde forma una estructura quelante.

En lo que refiere a la estructura la PC, el grupo colina tiene una carga positiva en el grupo trimetilamino con un pKa de disociación en un valor inferior a 3,5 [10]. Sin embargo, como se observa en la Figura 1.5, por razones estéricas, la carga negativa del grupo fosfato y la carga positiva del átomo de nitrógeno no interactúan. En consecuencia, la molécula de PC tiene un gran momento dipolar y lleva una carga positiva. Ambas propiedades hacen que la molécula sea hidrofílica, por lo que su coeficiente de partición entre el aceite y el agua estará fuertemente del lado del agua, lo que explica por qué es extraída principalmente con el desgomado acuoso.

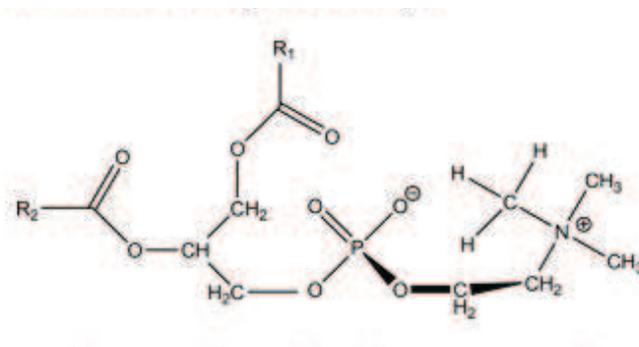


Figura 1.5. Estructura química de la fosfatidilcolina en los aceites vegetales sin desgomar

El PI también tiene un grupo fosfato que se disocia a pH neutro y pierde su carga negativa en su valor de pKa que está por debajo de 3,5. Entonces, en un ambiente ácido, no tiene carga y solo un pequeño momento dipolar. Se ha mencionado en la literatura [11] que el inositol tiene una afinidad mucho menor por el agua que el grupo colina cargada, pero sus cinco grupos hidroxilo hacen que sea hidrofílico, por lo que su coeficiente de partición, al igual que el coeficiente de PC, está fuertemente en el lado del agua [9].

En base a lo desarrollado, en esta tesis se trabajará solamente con los residuos obtenidos de la primera etapa del desgomado, dado que serán los que poseerán mayor contenido de PC. Además, se trabajará principalmente con lecitinas, que son el residuo de desgomado acuoso luego de una etapa de secado. Las lecitinas, a diferencia de las gomas, presentan la ventaja de tener una composición más uniforme y esto contribuye a poder realizar un estudio de manera más sistemática a partir de una dada materia prima uniforme. En el caso de las gomas, éstas son una emulsión que presenta variaciones en la composición, no sólo a nivel industrial dependiendo del aceite y las condiciones del proceso, sino a escala laboratorio la emulsión también presenta variaciones, por ejemplo, entre la zona superior e inferior del recipiente que las contenga, y además no son estables en el tiempo, presentando procesos rápidos de fermentación y descomposición. Esto se minimiza luego de la etapa de secado que genera como producto las lecitinas. Éstas pueden también estar sometidas a nuevas etapas de purificación o refinado en función de su uso (retirando por ejemplo el aceite o los compuestos que le otorgan el color).

La lecitina se puede definir como una mezcla compleja de fosfátidos (fosfolípidos) compuesta en su mayor parte por fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilinositol, combinados con otras sustancias tales como triglicéridos, ácidos grasos y carbohidratos. Es importante resaltar que los fosfolípidos son insolubles en acetona. La consistencia de la lecitina en los grados natural y refinado puede variar desde plástica a fluida, en polvo o gránulos, dependiendo del contenido de ácidos grasos y de aceite y de la presencia o ausencia de otros diluyentes. Su color varía de amarillo pálido a pardo dependiendo del origen y de si se le aplicó un proceso de blanqueamiento o no. Es inodora o con olor y sabor característico suave [12].

La lecitina es sólo parcialmente soluble en agua, pero se hidrata fácilmente formando emulsiones. Cuando están presentes todas las fracciones de fosfátidos, la lecitina es parcialmente soluble en etanol y prácticamente insoluble en acetona [12].

Para su uso comestible, en el Código Alimentario Argentino se detallan valores de referencia o límites según:

- Insoluble en hexano: máx 0,3%.
- Insoluble en acetona (fosfátidos): mín 50,0%.
- Índice de acidez: máx 36.
- Arsénico, como As: máx 3 ppm.
- Metales pesados, como Pb: máx 0,004%.
- Plomo: máx 10 ppm.
- Índice de peróxido: máx 10,0.
- Agua: máx 1,5%.

1.3. Aprovechamiento de los Fosfolípidos

Tal como se mencionó anteriormente, los fosfolípidos son de amplia utilidad en la industria farmacéutica. En este sentido, y en particular la fosfatidilcolina, con alto grado de pureza, y adquirida de diversas fuentes presentes en la naturaleza (yema de huevo, semilla de sésamo, semilla de soja, etc.), se utiliza como adyuvante para vacunas. Esto tiene un rol fundamental en la efectividad de una vacuna, ya que el adyuvante modifica el efecto del fármaco, estimulando o potenciando la respuesta inmunitaria del medicamento [13].

Se propone entonces, obtener PC concentrada a partir de las “gomas”, para ser utilizada como adyuvante en vacunas. Esto implica purificar y fraccionar las “gomas” hasta obtener una fracción rica en PC.

Entre los métodos de purificación y obtención de PC más difundidos, se encuentran extracción por solvente, tratamiento por solvente luego de modificación química, ultrafiltración, cromatografía, extracción con fluidos supercríticos, entre otros.

Según reporta Zhang y colaboradores [14], se encuentran numerosos estudios sobre la separación y purificación de fosfolípidos. La misma es usualmente llevada a cabo mediante diversas técnicas cromatográficas, como ser cromatografía de capa delgada (TLC por sus siglas en inglés) [15,16], cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC por sus siglas en inglés) [17-21], cromatografía de columna a baja presión (LPCC por sus siglas en inglés) [14,22], etc. Entre los métodos mencionados, TLC tiene como desventaja la dificultad de recuperar posteriormente los productos. Por otro lado, HPLC tiene altos niveles de eficiencia a medida que se reduce el diámetro de columna, sin embargo, el costo del equipamiento y el mantenimiento del mismo son elevados. Además, ambas TLC y HPLC, no cuentan con la posibilidad de ser escaladas industrialmente. Por otro lado, LPCC exhibe una ventaja con respecto a la factibilidad de ser realizado a gran escala, ya que cuenta con baja complejidad operacional y bajo costo. No obstante, en este último caso, puede llegar a resultar un problema adicional la recuperación de el/los solvente/s utilizado/s.

Mediante el método LPCC [23,24], se ha reportado que, con metanol como solvente para la elución isocrática en columna de sílice, se obtienen valores de pureza cercanos a 90% de PC [14]. Paralelamente, estudios demuestran que, utilizando una mezcla de éter de petróleo, 2-propanol y agua en proporciones volumétricas de 1:1:0,175, con una columna de sílice, se han logrado valores de pureza que rondan el 95 % de PC [23].

El etanol es un disolvente muy elegido como enriquecimiento de PC debido tanto a razones toxicológicas como a la alta solubilidad del PC en etanol, pero la extracción con etanol no es suficiente para obtener PC de alta pureza, ya que la fosfatidiletanolamina (PE) también es soluble en etanol en una medida significativa. Hoy en día, la separación cromatográfica parece ser el método de elección para preparar tanto PC de alta pureza como otros fosfolípidos. Sin embargo, el principal problema de los métodos cromatográficos es el gran volumen de disolvente que interviene en la separación, lo que hace que el proceso sea muy caro.

Otra alternativa son los sistemas de extracción líquido-líquido. Tal como se encuentra reportado [24], por ejemplo, mediante el uso de una fase no polar como el

hexano y una fase polar como el acetonitrilo, se puede extraer PC en la segunda fase. En este caso, se reportan purezas de 85%.

Adicionalmente, dentro de los sistemas de extracción líquido-líquido, se encuentra reportado [25] que es utilizando como solvente de extracción una solución formada por un solvente polar (isopropanol o etanol) y un solvente no polar (hexano), y luego filtrando a través de membranas de ultrafiltración [26] semipermeables bajo presión. Por ejemplo, utilizando membranas de poliacrilonitrilo con valores de cut-off (valor mínimo de peso molecular a partir del cual el 90% de los solutos queda retenido) de 15.000 Da. Así, se obtienen valores de aproximadamente 65% de pureza de PC.

Por otro lado, también se ha reportado que se puede separar PC mediante extracción con fluidos supercríticos [27,28]. El CO₂ es el más difundido por ser un solvente seguro, de fácil disponibilidad y bajo costo. Sin embargo, una de las principales desventajas del método es el elevado costo inicial de inversión en comparación con técnicas de extracción a presión atmosférica. De todos modos, el proceso en sí no cuenta con altos costos operativos y es fácilmente escalable. Otro beneficio es que es prácticamente inocuo y con un mínimo de generación de residuos no recuperables. Por ejemplo, según se reporta en [28], se realiza extracción de PC con CO₂ supercrítico y etanol (aproximadamente 10 % p/p), obteniendo selectividades que rondan el 95% con respecto a PC.

Una alternativa interesante para la separación selectiva de los fosfolípidos, es la combinación de disolución y extracción con diferentes solventes. Algunos reportes indican que, según el solvente usado, se puede disolver preferentemente alguno de los fosfolípidos. Por ejemplo, el uso de mezclas de etanol/isopropanol extrae preferentemente la PC [29], mientras que una mezcla de etanol/cloroformo extrae simultáneamente PC y PE [30].

Dentro de la misma línea, en lo que respecta a la separación por solvente, se le suma un tratamiento térmico previo con un hidrocarburo como ser el hexano a temperaturas que oscilan los 200°C. Dicho tratamiento térmico podría realizarse con un evaporador de capa delgada, por ejemplo. En este caso, se reportan purezas alcanzadas de hasta 98% [29].

También, complementando la separación por solvente, se encuentra reportado [30] que luego de extracciones del aceite de la lecitina cruda, se puede tratar la muestra con una solución alcohólica, y luego someterla a ultrasonido, utilizando como material absorbente nanopartículas preparadas a partir de precipitación de Fe_3O_4 . En una iteración, la pureza obtenida de PC es de 87%. Sin embargo, al realizar más iteraciones, se obtuvieron valores superiores.

Como se puede observar, la gran mayoría de los métodos reportados para obtener purezas elevadas de PC, implican el uso de variables de proceso extremas y/o costosas, como ser el empleo de condiciones supercríticas o tecnologías que requieren grandes cantidades de solventes. Es por ello, que en esta línea de investigación existen gran cantidad de alternativas a estudiar, mediante la variación de solventes y formas de extracción, lo cual presenta una oportunidad para desarrollar un proceso económico y práctico para el aprovechamiento de los residuos del desgomado de aceites.

1.4. Referencias

- [1] Galhardo, F., Dayton, C., Autino, H., Odone, M., Imoda, V. y Lascano, A. Aceites y Grasas (2010), 79, 204-212 (<https://asaga.org.ar/ag/079/mobile/index.html#p=46>).
- [2] D. L. Lamas, Tesis de Doctor en Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Universidad Nacional del Sur (Bahía Blanca) (2014).
- [3] W. Van Nieuwenhuyzen, JAOCS 53 (1976) 425.
- [4] Willem van Nieuwenhuyzen and Mabel C. Tomás. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 110 (2008) 472–486.
- [5] S. Ziller. Grasas y aceites 1 (2000). 270-281.
- [6] Maraber, E. Desgomado de Aceites crudos. Alfa Laval Argentina.
- [7] Romero, J. UCR: academia.edu/35214556/DESGOMADO_DEL_ACEITE_DE_SOYA (2021)
- [8] A. J. Muratorio, C. A. Kerlakian, Aceites y Grasas 2 (2004) 316-323.
- [9] Albert J. Dijkstra. E. J. of Lipid Science and Technology (2017). Vol 119, Issue 9.
- [10] Tatulian, S. A., in: G. Cevc (Ed.), Phospholipids Handbook, Marcel Dekker, Inc, NY (1993), 511– 552.
- [11] Dayton, C. L. G., Rosswurm, E. M., Galhardo, F., PCT Patent Application WO (2008) 094847.
- [12] CAA, Capítulo XVIII Aditivos.
- [13] E. Prochetto y col., Oncotarget. 8(35) (2017) 58003-58020.
- [14] W. Zhang y col., Journal of Chromatography B 798 (2003) 323-331.
- [15] G. Lendrath, A. Nasner, L. Kraus, J. Chromatogr. 385 (1990) 502.

- [16] J. Touchstone, J. Chromatogr. 169 (1995) 671.
- [17] T.H. Yoon, I.H. Kim, J. Chromatogr. 209 (2002) 949.
- [18] J.J. Myher, A. Kuksis, J. Chromatogr. 3 (1995) 671.
- [19] B.D. Meulenaer, P.V. Meeren, J. Vanderdeelen, L. Baert, Chromatographia 41 (1995) 527.
- [20] W.J. Hurst, R.A. Martin, R.M. Sheeley, J. Liq. Chromatogr. 2969 (1986) 9.
- [21] P.E. Balaza, P.L. Schmit, B.F. Szuhaj, J. Am. Oil Chem. Soc. 193 (1996) 73.
- [22] B. Tamargo-Santos et al. Revista Cubana de Química Vol XXIII, 3 (2011).
- [23] B. Günther et al. United States Patent No US4983327A (1988).
- [24] R.D. Jangle et al. / Separation and Purification Technology 102 (2013) 187–195
- [25] A. Kumar Sen Gupta, European Patent Office No. EP0049914A1 (1984).
- [26] N Aryanti et al. J. Phys. Conf. Ser. 909 012083 (2017).
- [27] L. Teberiklera, S. Koseoglub, A. Akgermana, JAOCS 78, no. 2 (2001).
- [28] E. Reverchon, I. De Marco, J. of Supercritical Fluids 38 (2006) 146–166.
- [29] J. D. Weete et al. United States Patent No US5703255A (1993).
- [30] Khosrowaninia et al. United States Patent No US0225429A1 (2015).

Capítulo 2

METODOLOGÍA

2. METODOLOGÍA

2.1. Introducción

En el desarrollo de esta tesis se ha estudiado la puesta en valor del residuo del desgomado mediante la separación de las distintas fracciones de fosfolípidos que la conforman. El procedimiento a seguir en cada una de las etapas del estudio dependerá fuertemente de las características de la materia prima que se emplee y los productos que se busquen obtener. En este capítulo se describe en forma detallada el equipamiento y las condiciones en que se realizaron las distintas experiencias, así como también las técnicas analíticas empleadas, desde la materia prima hasta el producto final.

2.2. Materias Primas y reactivos

La materia prima utilizada fue:

- *Lecitina*: es el resultado de secar las gomas (residuo del desgomado acuoso proveniente del refinamiento de aceites). Posee una consistencia como de una melaza (Foto 2.1). La composición promedio es de 68 % de fosfolípidos y un 31 % de aceite y 1 % de otras impurezas [1]. Las muestras de lecitina fueron provistas por empresas aceiteras de la zona.

Los solventes utilizados para realizar las extracciones fueron los siguientes:

- Acetona Pro-análisis
- Metanol absoluto Pro-análisis
- Isopropanol Pro-análisis
- Etanol absoluto Pro-análisis
- Etanol 96 % V/V



Foto 2.1: Fotos de la materia prima usada: Lecitina.

2.3. Experiencias de Extracción

Las extracciones se realizaron variando los solventes involucrados, así como el orden en que se agregaron, la temperatura y el tiempo de contacto. En líneas generales, la operativa consistió en un paso de extracción con solvente en forma batch, seguida de una etapa de separación y una de secado. A continuación, se detalla el procedimiento común de cada una de estas etapas.

2.3.1. Etapa de extracción

Se parte de 4 gramos de lecitina, que se colocan en un recipiente. Los recipientes utilizados consisten en tubos de centrífuga plásticos (Foto 2.2.A y Foto 2.2.B). Luego se adiciona la cantidad correspondiente de solvente y se somete el recipiente a las condiciones de temperatura, según corresponda a 5°C o a 60°C, con agitación, de manera tal de obtener homogeneidad en la mezcla, y un tiempo determinado según cada experiencia en particular.

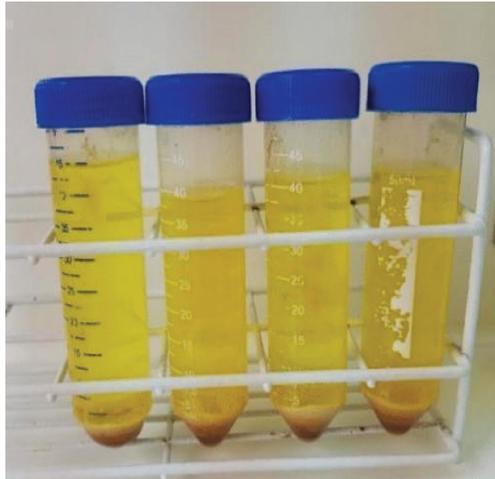
Específicamente, las etapas de extracción con acetona se realizan a 5°C durante 15 minutos, ya que la norma para la determinación de insolubles en acetona establece que estas condiciones garantizan una extracción efectiva. Por otro lado, para las extracciones alcohólicas, considerando las temperaturas mencionadas en la bibliografía (Introducción, sección 1.3: Aprovechamiento de los Fosfolípidos), se decidió realizar las extracciones a 60°C según se reporta en [2]. Esta temperatura permite uniformidad en los experimentos con los diferentes alcoholes utilizados y, además, se encuentra por debajo del punto de ebullición del alcohol más volátil (metanol).

2.3.2. Separación y secado

Una vez transcurrido el tiempo de extracción, se procede a la separación del solvente por centrifugación.

Posteriormente, se procede al secado de ambas fases bajo evaporación con vacío (76 cmHg de vacío) (Foto 2.3), que se aplica directamente en el tubo de extracción. En el caso de los alcoholes la evaporación se realizó en un baño termostático a 60 °C, a fin de acelerar el proceso.

A



B

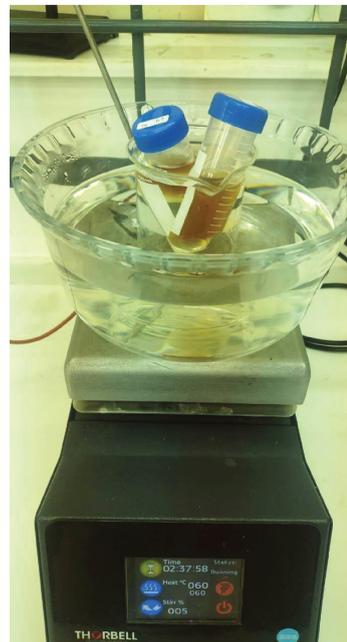


Foto 2.2: Experiencias de extracción en **A**: tubos plásticos de centrifuga luego de la extracción y centrifugación y **B**: tubos plásticos de centrifuga en etapa de extracción



Foto 2.3: Sistema empleado para el secado en vacío de las muestras extraídas.

2.3.3. Experiencias con extracciones sucesivas

En algunas experiencias se combinaron sucesivas etapas de extracción usando iguales o distintos solventes. Para ello se tomó la fase rica en PC, posterior al secado, y se puso en contacto nuevamente con solvente y se somete la muestra a las condiciones correspondientes al solvente a usar. Se operó alternando los pasos descritos en las secciones 2.3.1 y 2.3.2. Se llegaron a realizar hasta 3 etapas de separación.

Vale aclarar que en los casos en que dos extracciones consecutivas conservan el mismo solvente de extracción, no se realiza el paso de secado en vacío, sino que solo se procedió a realizar la separación de fases.

2.4. Caracterización

2.4.1. Materia Prima

Los residuos del desgomado sobre los cuales se trabaja, tienen apariencia pastosa y su comportamiento reológico es complicado. Para su caracterización no solo se han utilizado técnicas analíticas empleadas habitualmente en el laboratorio para aceites y materiales oleosos, sino que además fue necesario poner a punto nuevas técnicas analíticas específicas para esta materia prima. Para ello se tomó como base las

técnicas usadas para lecitinas. Las principales técnicas empleadas se resumen a continuación:

- *Fósforo* (g fósforo/100 g muestra):

Se determina el contenido de fósforo o sus equivalentes fosfátidos presentes en la muestra. El contenido de fósforo obtenido se afecta por un factor de 31 (relación entre el peso molecular promedio de los fosfolípidos y el fósforo), obteniéndose así el contenido de fosfolípidos. La determinación de fósforo se realiza según la norma AOCS Ca 12-55: el fósforo contenido en la muestra es transformado en un ion complejo (fosfomolibdato) y cuantificado mediante medición de absorbancia (fotocolorimetría) [3]. Se detalla el método en Anexo 1.

- *Material Insoluble en Acetona* (AIM, por sus siglas en inglés) (g AIM/100 g muestra):

El material insoluble en acetona está directamente relacionado con el contenido de fosfolípidos en la materia prima, debido a que el resto de componentes que conforman las gomas (agua, aceite, y otros en menor proporción) son solubles en acetona. Es una técnica usada para cuantificar el contenido de fosfolípidos y al mismo tiempo aislarlos. Se aplica la norma AOCS Ja 4-46 (detallado en Anexo 2): Mediante sucesivas extracciones con acetona se logra aislar a los fosfolípidos, y por diferencia de peso se puede determinar el contenido de los mismos [4]. Se detalla el método en Anexo 2.

- *Contenido de humedad* (g agua/100 g muestra):

Para la determinación de agua en las gomas y borras se sigue la norma AOCS Ja 2-46: El contenido de humedad se determina mediante una destilación a reflujo con tolueno. El agua que se va evaporando se recolecta en un tubo graduado y en él se lee el contenido de agua de la muestra [5]. Se detalla el método en Anexo 3.

2.4.2. Producto

Una vez realizados los distintos procedimientos de extracción y separación a fin de obtener una fase rica de PC, se analiza la misma según:

-
- *Cromatografía en capa delgada* (TLC, Thin Layer Chromatography por sus siglas en inglés):

La implementación, puesta a punto y optimización de esta técnica es uno de los objetivos de esta tesis, dado que permite realizar un análisis importante en la industria oleoquímica, obteniendo resultados en forma cuali y cuantitativamente con buena precisión, sin utilizar equipamientos de alto costo como el cromatógrafo líquido de alta performance.

Se aplica la norma AOCS JA 7-86 [6], así como también una técnica derivada de ésta. Se utilizan placas cromatográficas de sílica gel con base de aluminio, (TLC Silica gel 60 F₂₅₄ 20 x 20 cm) marca Merck. Las corridas se realizan en dos dimensiones usando como primera fase móvil (Fase A) una solución de cloroformo-metanol-hidróxido de amonio (65:30:5 v/v) y la segunda cloroformo-metanol-ácido acético-agua destilada (75:11:11:3, v/v) (Fase B). También se realizan corridas en una dimensión empleando las mismas fases (A y B) por separado. Las muestras a analizar se disolvieron en hexano en distintos porcentajes según la necesidad.

Para las corridas cromatográficas en dos dimensiones, siguiendo lo señalado por la norma mencionada, se operó de la siguiente forma:

- Se cortaron las placas cromatográficas en rectángulos de 6 x 6 cm, de ahora en más denominadas como fase estacionaria (FE). Se trazó una línea con lápiz a aproximadamente 0,5 cm del borde superior y otra a 0,5 cm del borde izquierdo. Con esto se buscó delimitar la corrida del solvente, definiendo así el mismo frente de solvente para todas las experiencias. Paso seguido se procedió a la siembra de la muestra en el extremo inferior derecho, con ayuda de un capilar de plástico. La siembra se realizó de manera tal que quedara a 0,5 cm de distancia de cada borde (el inferior y el derecho), con lo que queda delimitada en la placa una superficie de 5 x 5 cm para que se desarrolle la muestra. Esto se ejemplifica en la Figura 2.1.

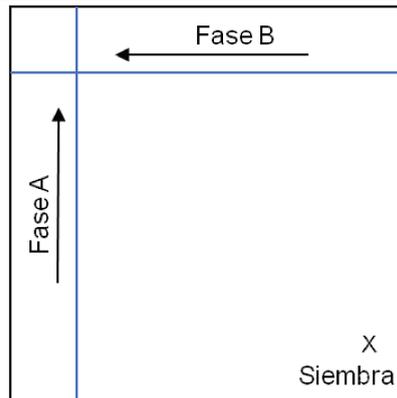


Figura 2.1. Placa de TLC sobre la que se realiza la corrida cromatográfica, con el punto de siembra y los frentes de corrida de las dos fases móviles especificadas.

Paso seguido, la placa se deposita en forma vertical en la posición en la que se muestra en la Figura 2.1, dentro de una cuba de cromatografía, asegurando que la siembra esté por encima del nivel de la fase móvil en la cuba, según se muestra en Figura 2.2. La Fase móvil A asciende a lo largo de la placa por capilaridad, desplazando a los componentes de la mezcla a diferentes velocidades, lo que provoca su separación. La cuba que se utiliza en las experiencias es de vidrio (frasco de 100 mL con tapa)

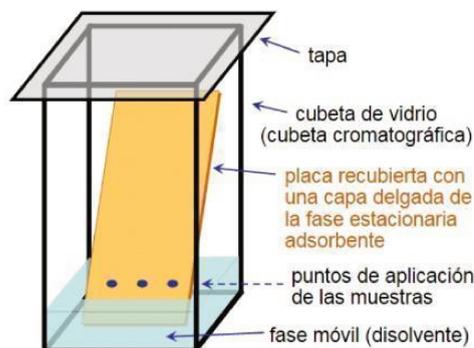


Figura 2.2. Cuba de vidrio con una de las fases móviles donde se colocó una placa de TLC previamente sembrada con la muestra a analizar.

Cuando el frente del disolvente se encuentra próximo al extremo superior de la placa (en la línea marcada a 0,5 cm del borde), ésta se retira de la cuba con ayuda de una pinza y se procede a secar frente a un secador de corriente de aire caliente para evaporar el solvente.

Luego se rota la placa 90° en el sentido horario y se coloca en otra cuba que contiene la segunda fase móvil (FM B). Cuando el solvente llega a la línea marcada a 0,5 cm del borde la misma se retira de dicha cuba, se coloca la placa frente a un secador de corriente de aire caliente para evaporar el solvente y posteriormente se revela con vapores de yodo, los cuales colorean las distintas bandas permitiendo su visualización.

En la Figura 2.3 se observa una placa revelada en donde se identifican los distintos fosfolípidos que conforman la muestra de una lecitina analizada (placa rotulada “Lecitina”). Para la identificación de los compuestos se usó de guía lo especificado por la norma y se chequeó la identificación correspondiente a la PC con un patrón de fosfatidilcolina que posee una pureza del 95 %p/p.

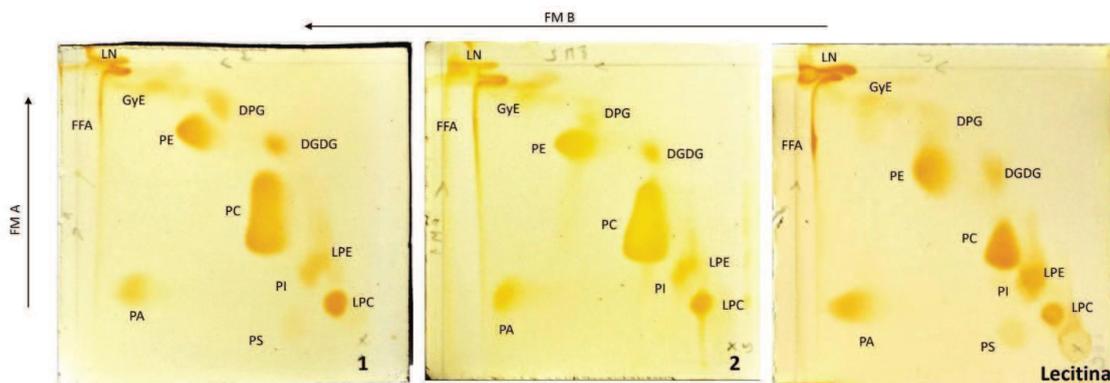


Figura 2.3. Placas cromatográficas realizadas de acuerdo a norma AOCS JA 7-86 de muestras de “Lecitina” (obtenida de planta), 1 y 2: Lecitina luego de una extracción con Etanol, tomando la fase soluble, seguido de dos extracciones con Acetona..

FFA: ácidos grasos libres; PC: fosfatidilcolina; PE: fosfatidiletanolamina; PS: fosfatidilserina; PI: fosfatidilinositol; PA: Acido fosfatidico; LPC: liso-fosfatidilcolina; LPE: liso-fosfatidiletanolamina; LN: lípidos neutros; DGDG: Glicérido Digalactosil; DPG: Difosfatidilglicerol; GyE: glucósidos y esterolés.

En las placas 1 y 2 puede verse que se obtiene una muy buena repetitividad en el análisis, logrando una resolución prácticamente idéntica en los análisis replicados.

En forma complementaria al análisis de fosfolípidos en dos dimensiones descrito por la norma, se puede realizar más de una corrida en la misma placa cromatográfica, realizando más de una siembra en las “calles” de la margen izquierda y/o superior de la placa, según se esquematiza en la Figura 2.4. Las siembras complementarias (x’ y x’’) a la original (x) podrían ser de la misma muestra, o bien, en

las “calles” se pueden sembrar compuestos patrones que permitan realizar una mejor identificación.

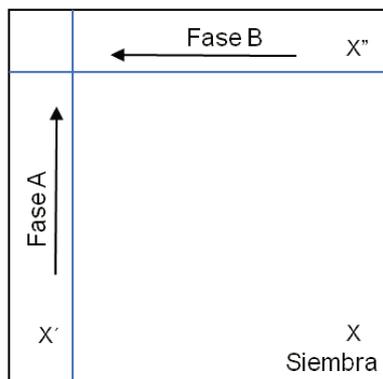


Figura 2.4. Placa de TLC sobre la que se realizan varias corridas cromatográficas, con los puntos de siembra (x, x' y x'') y los frentes de corrida de las dos fases móviles especificadas.

Al sembrar en las “calles” la misma muestra que en el punto de siembra, se vería el perfil de fosfolípidos que es capaz de resolver cada una de las fases en forma independiente.

Con el objetivo de determinar si el análisis en una dimensión permite obtener resultados con la precisión suficiente para el estudio de purificación de fosfatidilcolina, se realizaron corridas en una sola dimensión, para lo cual se procedió de la misma forma descrita más arriba, pero utilizando una sola de las fases. Por ejemplo, tal como se muestra en la Figura 2.5, se procedió a correr en placas de TLC de una dimensión (figura inferior), en este caso particular con la Fase B de la norma AOCS JA 7-86 [7]. Se puede observar que, al no haber dispersión en ambas direcciones, los compuestos no salen separados y de manera aislada entre sí, sin embargo, es suficiente para identificar los principales compuestos de interés. Para verificarlo, se compara con la placa en la cual se corrió en 2 dimensiones. Se puede apreciar que en el análisis realizado con la Fase B, la PC puede presentar un muy pequeño solapamiento con el PI. No obstante, los análisis mostrados en la Figura 2.3, con la metodología ya ajustada, muestran que es posible resolver estos dos compuestos. Por otro lado, la LPC y LPE salen prácticamente en una misma señal, pero como esto no afecta la cuantificación de la PC no es necesario que estos dos compuestos sean resueltos en el análisis, al menos no en el marco de los objetivos de este estudio.

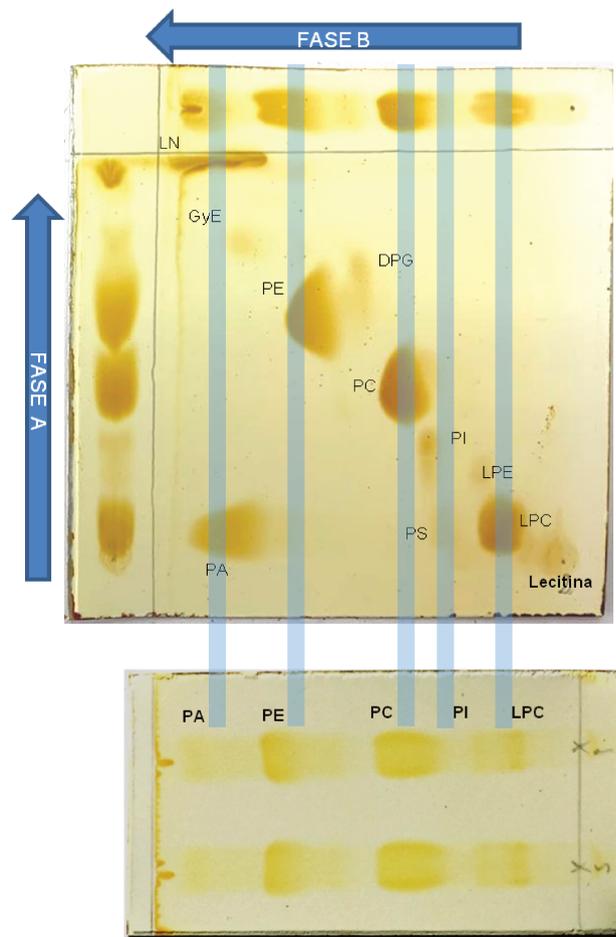


Figura 2.5. Corridas cromatográficas de una muestra de lecitina en 2D (imagen superior) y en 1D usando la Fase B (imagen inferior). PC: fosfatidilcolina; PE: fosfatidiletanolamina; PI: fosfatidilinositol; LPC: liso-fosfatidilcolina; PA: ácido fosfatídico.

- ImageJ:

La herramienta informática ImageJ ha sido reportada para cuantificar las intensidades obtenidas de placas de TLC [7], y así poder estimar concentraciones relativas. Este procesamiento es válido para las placas corridas en una dimensión. Tal como se muestra en la Figura 2.6, el software transforma en datos numéricos las intensidades obtenidas en la placa de TLC, los cuales luego pueden graficarse y realizar la identificación y cuantificación relativa de los picos presentes.

Específicamente, desde el software ImageJ, a partir de la placa de TLC, se obtiene una tabla de datos, en la cual se relacionan las intensidades detectadas, y la

longitud de la placa. Luego dichos datos son trasladados a una planilla de cálculo, para poder graficarlos y obtener así los valores de áreas de los picos. Se obtienen los valores de áreas de todos los picos, para poder luego calcular el contenido de los compuestos de interés, según la Ecuación 1.

$$\% \text{ compuesto de interés} = \frac{\text{Área}_{\text{compuesto de interés}}}{\sum \text{Área}_{\text{compuestos}}} \quad (\text{Ec. 1})$$

A continuación, se muestra una gráfica realizada en Excel de los datos obtenidos con el software ImageJ, y se superpone la imagen de una placa de TLC, para que resulte más sencillo la identificación de los picos.

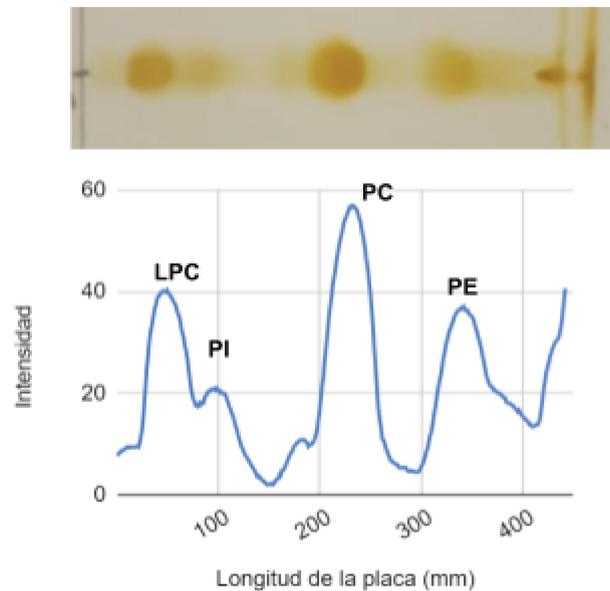


Figura 2.6. Análisis de la placa de TLC a través del software ImageJ

2.5. Referencias

- [1] Sartoretto, P., in "Kirk Othmer Encyclopedia of Chemical, Technology," 2nd Edition, Vol. 12, Interscience Publishers, New York (1967), pp. 343-361.
- [2] Dario M. Cabezas. Food Industry (2013) 25, 589-602.
- [3] Fósforo (g fósforo/100 g muestra), Norma AOCS Ca 12-55
- [4] Material Insoluble en Acetona (AIM)(g AIM/100 g muestra), AOCS Ja 4-46
- [5] Contenido de humedad (g agua/100 g muestra), AOCS Ja 2-46
- [6] Concentración de fosfolípidos en lecitina por cromatografía en capa delgada, AOCS Ja 7-86
- [7] Gerhard Helmerich and Peter Koehler, . Agric. Food Chem. 2003, 51, 6645 – 6651

Capítulo 3

PUESTA A PUNTO DEL MÉTODO DE CROMATOGRAFÍA DE CAPA DELGADA

3. PUESTA A PUNTO DEL MÉTODO DE CROMATOGRAFÍA DE CAPA DELGADA

En este capítulo se estudia la puesta a punto del método cromatográfico, TLC, que permite la separación de los distintos fosfolípidos sobre una placa de sílice. Se analiza la sensibilidad del método a los diferentes parámetros que intervienen en el método analítico, como la composición de la fase móvil, temperatura y volumen de fase durante la elución. Es importante realizar este estudio, a fin de dar importancia y observar aquellos parámetros que tengan alto impacto en la capacidad de resolución de los compuestos de la muestra. Se busca lograr la implementación del método analítico obteniendo resultados confiables y repetitivos.

3.1. Introducción

La Sociedad Americana de Químicos del Aceite (American Oil Chemists' Society – AOCS-) establece como métodos validados de determinación de fosfolípidos en las lecitinas los presentados en las normas Ja 7b-91 [1] y Ja 7-86 [2]. La primera se refiere a la cromatografía líquida mediante el uso de un HPLC, mientras que la segunda a la cromatografía de capa delgada. El empleo de un cromatógrafo líquido (HPLC) resulta costoso y requiere de personal altamente calificado para su ejecución, lo cual hace atractiva la utilización de cromatografía de capa delgada.

En bibliografía se han reportado numerosos trabajos sobre la separación de lípidos y fosfolípidos (PL) de distintas matrices empleando cromatografía de capa delgada (TLC), muchos de los cuales son adaptaciones menores de los métodos existentes para adecuarse a las condiciones en estudio. Por ejemplo, Turner et al. [3] reportan el empleo de placas de gel de sílice que contienen acetato de magnesio al 7,5%, con una fase móvil de cloroformo-metanol-amoniaco (65:25:4, v/v/v) para lograr la separación de fosfolípidos extraídos de la sangre humana. Wang et al. [4] utilizaron una fase móvil de cloroformo-metanol-agua (25:10:1, v/v/v) para separar los distintos fosfolípidos en una matriz de plasma cuando su contribución es pequeña. Por otro lado, Aloisi et al. [5] estudiaron una combinación distinta de estos compuestos, cloroformo-metanol-agua (65:25:4, v/v/v), reportándose una mejor calidad de separación de los estándares de PL. Un sistema disolvente más adecuado para mezclas

complejas de lípidos es acetato de metilo-isopropanol-cloroformo-metanol y KCl acuoso al 0.25% (25:25:25:10:9, v/v/v/v/v) como lo refleja en sus estudios Vitiello et al. [6]. Stephanie et al. [7] reportan el uso de High-Performance Thin-Layer Chromatography (HPTLC) para la caracterización de la lecitina de girasol. Lograron una separación satisfactoria de los fosfolípidos empleando como fase estacionaria, placas de gel de sílice 60 F254 y una mezcla de cloroformo-metanol-agua-amoniaco (25%) (30:17:2:1, v/v/v/v) como fase móvil.

Un aspecto a resaltar es que todo lo mencionado anteriormente corresponden a corridas en TLC en una sola dimensión. Sin embargo, también se encuentra reportado en bibliografía corridas en TLC en dos dimensiones. Por ejemplo, la AOCS propone [8] una técnica para separar fosfolípidos de lecitina mediante metodología TLC en dos dimensiones. Para la primera elución se emplea una solución de cloroformo-metanol-hidróxido de amonio (65:30:5 v/v) y luego para la segunda corrida se utiliza cloroformo-metanol-ácido acético-agua destilada (75:11:11:3, v/v).

Con base en lo encontrado en bibliografía y lo recomendado por la AOCS, en este capítulo se busca reproducir y adaptar los métodos existentes para evaluar la separación de fosfolípidos mediante diferentes métodos de extracción y purificación.

3.2. Validación de la metodología AOCS

La técnica propuesta por AOCS [8], consiste en realizar corrida de TLC en dos dimensiones, usando hexano como disolvente de la muestra, como primera fase móvil (Fase A) una solución de cloroformo-metanol-hidróxido de amonio (65:30:5 v/v) y luego para la segunda corrida se emplea cloroformo-metanol-ácido acético-agua destilada (75:11:11:3, v/v) (Fase B). Esto, ya fue descrito en detalle en el Capítulo 2 de Metodología.

En primera instancia se realizaron diferentes corridas de una muestra de lecitinas. Para ello se usó una lecitina que presentaba una concentración de fosfolípidos del 69,8%, menos del 1% de agua y un 30% de aceite e impurezas menores. La muestra se sembró diluida en hexano en una relación 1:100.

En la Figura 3.1 se observan las placas cromatográficas luego de ser reveladas. Como se puede observar, no hay repetitividad en las corridas. En una sola de ellas se logró una separación de los fosfolípidos, de manera tal de poder proceder a su identificación (Figura 3.1.A). En el resto de las placas se observa que la muestra corrió junto al frente de solvente sin llegar a separarse, resultando una zona coloreada en forma de línea recta sin resolverse los diferentes componentes (Figuras 3.1.B y C).

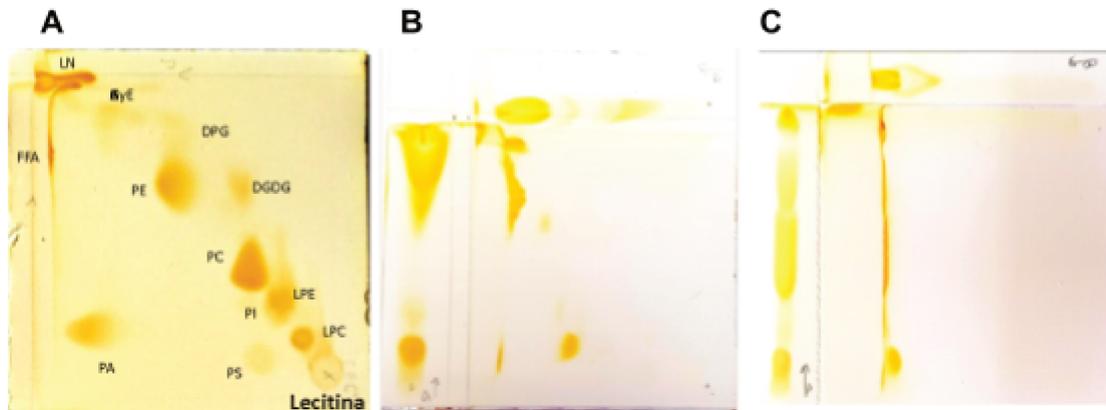


Figura 3.1. Placas cromatográficas de corrida en dos dimensiones de una misma lecitina, usando como fase móvil la Fase A y la Fase B.

En las placas B y C se puede observar que también se realizó en forma conjunta las corridas en una dimensión, en el lado izquierdo donde solo corre la Fase A, y en el superior, donde se corrió la Fase B, tal como se explicó en el capítulo anterior. Como se puede observar en la Figura 3.1.B la Fase A es la que no logra separar en forma diferencial los distintos fosfolípidos, corriendo todos en forma de dos grandes “manchas”. Por el contrario, en la Figura 3.1.C la Fase B pareciera ser la que no logra la separación de los diferentes compuestos.

Para determinar la causa de esta falta de repetitividad y poder afianzar la aplicabilidad del método, se corrió una muestra purificada en fosfolípidos. Para ello se le realizó una extracción con acetona a la lecitina, dado que como se describió más arriba, los fosfolípidos son insolubles en este solvente. Este residuo se denomina comúnmente AIM debido a sus siglas en inglés “acetone insoluble matter”. Al igual que con la lecitina, la muestra se diluyó 1:100 con hexano y se procedió a la corrida cromatográfica en 2D. Nuevamente se obtuvo una baja repetitividad.

Esto significa que hay una alta sensibilidad a algunas de las variables involucradas en el análisis, tales como composición de la fase, cantidad de solvente en el recipiente de análisis, y temperatura del sistema, por mencionar algunas variables que a priori aparecen como relevantes. Por lo tanto, es claro que esto demanda un estudio más sistemático, prestando especial atención a las diferentes variables, particularmente al rol que tiene cada uno de los solventes que conforman las fases móviles, poniendo el foco en aquellos que poseen una mayor presión de vapor, lo que hace que sea más factible que se pierdan por evaporación durante el manipuleo y ejecución de los análisis. Este cambio en la composición conduce a un cambio en la polaridad de la fase, reflejándose en la interacción con los fosfolípidos y, por lo tanto, en la forma en que eluyen. Este estudio es relevante dado que indicará la importancia de monitorear la composición de la fase móvil, y en qué nivel de variación de la composición puede esperarse un cambio en la respuesta durante el análisis.

3.3. Efecto de la composición de la fase móvil

Es necesario tener en cuenta los fundamentos de esta técnica para poder entender y prever el efecto de los diferentes parámetros en el resultado analítico. Por ejemplo, un cambio en la composición de la fase conducirá a una modificación de su polaridad, lo que tendrá un impacto en la resolución de las señales. Este estudio es indispensable para ajustar la técnica operatoria, de manera de lograr un procedimiento robusto que nos permita una determinación rápida y confiable para cuantificar fosfolípidos presentes en una lecitina. En el Anexo 4 se resumen en forma breve los fundamentos teóricos de la cromatografía de placa delgada (TLC).

La cromatografía TLC se funda en un equilibrio de fuerzas intermoleculares entre la fase móvil, los componentes de la muestra a analizar y la fase estanca. Este depende de la polaridad del material de revestimiento de la placa de TLC, de la polaridad del disolvente de desarrollo y de la polaridad de las moléculas de la muestra. La fase estacionaria está compuesta por una placa de aluminio sobre la cual se deposita un gel de sílice, con una polaridad muy alta, por lo que retendrá en mayor medida componentes más polares. Por su parte, la fase móvil (eluyente) debe de ser

menos polar que la fase estacionaria, de forma que los componentes que se desplacen con mayor velocidad sean los menos polares.

Por lo que, a fines de entender el efecto de la variación de los compuestos de las distintas fases móviles, es necesario conocer la polaridad de cada uno de ellos y la de la fase resultante. En la Tabla 3.1 se muestra el parámetro de polaridad propuesto por Reichardt [9], el cual está basado en la energía de transición de la mayor longitud de onda de la banda de absorción solvatocrómica de un colorante (E_T^N).

Por otro lado, si bien no se cuentan con datos de la polaridad de los distintos fosfolípidos que conforman las muestras a analizar, sí se puede estimar la diferencia de polaridad entre ellos. La diferencia relativa de polaridad está asociada a la polaridad del grupo funcional, por lo que se esperaría que la polaridad siga el siguiente orden:

$$PA > PI > PC > PE$$

Solvente	E_T^N
Cloroformo (CHCl ₃)	0,265
Metanol (MeOH)	0,796
Ácido Acético (C ₂ H ₄ O ₂)	0,657
Agua	1,000

Tabla 3.1. Solventes utilizados en las distintas fases móviles.

Otra forma más directa y sencilla es evaluar la fuerza total de elución de la fase móvil, la cual es una medida de la energía de adsorción del disolvente. En este caso se toma como referencia el sistema pentano-sílice pura al que se asigna el valor 0. La misma será calculada, basándose en el índice de Snyder [9], para la explicación de algunos de los cromatogramas obtenidos, empleando la Ecuación (2).

$$ST = \sum_{i=1}^n S_i \phi_i \quad (\text{Ec. 2})$$

Con ST= fuerza total de elución de la FM, S_i = Concentración del compuesto i, ϕ_i = fuerza de elución del compuesto i.

En la Tabla 3.2 se muestran la fuerza de elución de los compuestos usados en las fases móviles. Cabe mencionar que los valores mostrados en la tabla hacen referencia a lo que en cromatografía se denomina fase normal. Trabajar en fase normal implica que la fase estanca posea una polaridad mayor a la móvil.

Fase normal	
Compuesto	Fuerza
Cloroformo	0.40
Metanol	0.95
Ácido Acético, Agua	>1

Tabla 3.2: Serie de Snyder.

Fase Móvil A

Se analiza la influencia de los compuestos que conforman la Fase Móvil A sobre su polaridad y posterior separación de los distintos fosfolípidos en la corrida cromatográfica. Para ello se plantearon 4 experiencias, en donde se aumentó y disminuyó en 4 mL el cloroformo y 3 mL el metanol referido a las concentraciones iniciales. En la Tabla 3.3 se resumen las composiciones de las distintas fases móviles resultantes de estas modificaciones y la fase móvil original. El objetivo es obtener valores cuantitativos de la eficiencia de separación en función de variaciones relativamente pequeñas en las composiciones de los compuestos más volátiles.

En la Tabla 3.3 además se muestra la fuerza de elución (ST) de las Fases Móviles. Como se puede observar la variación en la concentración del cloroformo tiene un impacto menor sobre la misma en comparación a la fase original, modificando la fuerza de elución en aproximadamente un punto por arriba o por abajo. Por el contrario, la

concentración del metanol tiene un mayor impacto sobre la fuerza de elución, que cambia en casi 2 puntos por abajo o arriba, con la variación de 3 mL propuesta. Sobre la base de lo descrito es de esperar que los cambios más grandes se vean al usar las Fases A3 y A4.

Nombre	Cloroformo	Metanol	Hidróxido de amonio 7N	ST
Fase A Original	65 % (v/v) - 13 mL	30% (v/v) - 6 mL	5 % (v/v) – 0,8 mL	10,9
Fase A1	71 % (v/v) - 17 mL ↑	25% (v/v) - 6 mL	4 % (v/v) - 0,8 mL	12,5
Fase A2	56 % (v/v) - 9 mL ↓	37% (v/v) - 6 mL	7 % (v/v) - 0,8 mL	9,3
Fase A3	57% (v/v) - 13 mL	39% (v/v) - 9 mL ↑	4 % (v/v) - 0,8 mL	13,75
Fase A4	77 % (v/v) - 13 mL	19% (v/v) - 3 mL ↓	4 % (v/v) - 0,8 mL	8,05

Tabla 3.3. *Modificación de concentración de los componentes de Fase A. Con flechas se señala si se aumentó o disminuyó la concentración respecto de la concentración original.*

Las distintas fases se probaron realizando corridas cromatográficas 1D de una muestra de AIM disuelta en hexano en una proporción 1:100. Se corrió una muestra de fosfolípidos puros de manera tal de evitar cualquier efecto producido por el aceite que contiene la lecitina. En la Figura 3.2 se muestran las corridas de TLC de cada una de las fases A, y se señala en cada una dónde se encuentran los compuestos mayoritarios, como ser la fosfatidilcolina y la fosfatidiletanolamina.

Se puede observar que las Fases A1 y A2, no presentan un cambio significativo respecto de la placa corrida con la fase móvil original, en acuerdo con el análisis de la fuerza de elución analizada más arriba. Por el contrario, en las Fases A3 y A4, en las cuales se observaba un cambio más marcado en la fuerza de elución, se ven cambios notables en la definición de las señales obtenidas. Se ve que a mayor cantidad de metanol, lo cual implica una mayor fuerza de elución, se mejora la separación entre los compuestos prioritarios, y lo inverso para menor cantidad de metanol, que implica una reducción significativa en la fuerza de elución respecto de la Fase A original.

De esta forma, se logró evaluar la incidencia de los componentes de la Fase A para resolver los compuestos presentes en la muestra.

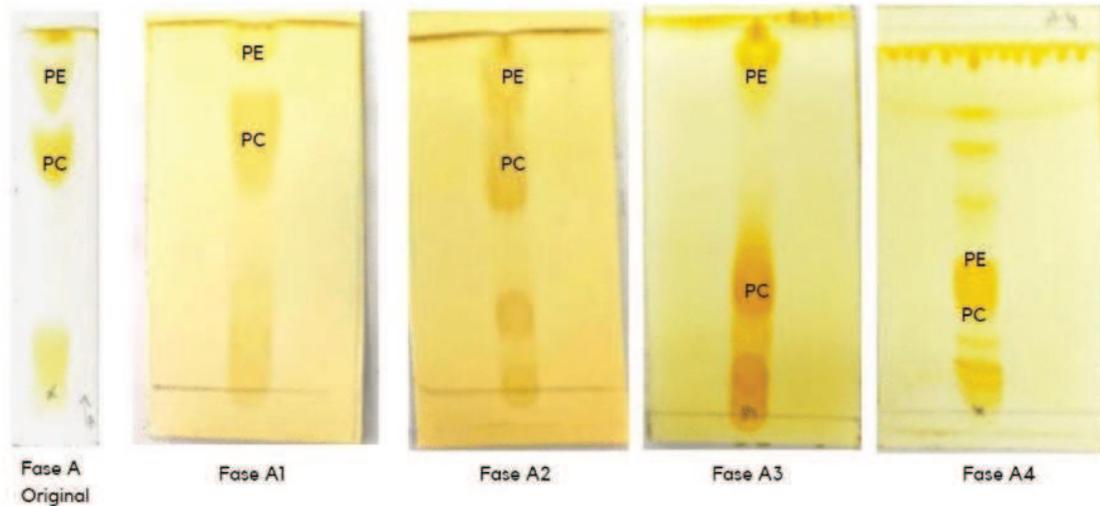


Figura 3.2. *Corridas TLC de AIM en de Fase A original, Fase A1, Fase A2, Fase A3 y Fase A4.*

Fase Móvil B

En la evaluación de la Fase B se puso el énfasis en el cloroformo, ya que es el compuesto principal de la mezcla y se encuentra aún en mayor proporción que en el caso analizado previamente, y además, la proporción de metanol en este caso es mucho menor. Para el estudio se realizaron 3 experiencias, reduciendo la cantidad de cloroformo en 1 mL, 2 mL y 4 mL; y una cuarta experiencia incrementando en 2 mL su dosificación, todo relativo a las cantidades originales. En la Tabla 3.4 se muestra en forma resumida la composición de las distintas Fases B y la fuerza de elución correspondiente. En el cálculo de esta última se toma como valor de elución del agua y el ácido acético 1,5. Estos valores sólo se usarán en forma comparativa.

Las nuevas fases móviles se hacen ascender por capilaridad sobre una placa donde se sembró previamente una muestra de AIM diluida en una relación 1:100 en hexano. Luego de la evaporación se revelaron con vapores de yodo, al igual que se procedió con el estudio de la Fase A. En la Figura 3.3 se muestran las placas de TLC resultantes de las corridas cromatográficas con las distintas fases móviles, y se indican los componentes mayoritarios.

Nombre	Cloroformo	Metanol	Ácido acético	Agua destilada	ST
Fase B Original	75% (v/v) - 17 mL	11% (v/v) - 2,5 mL	11% (v/v) - 2,5 mL	3% (v/v) - 0,6 mL	13,82
Fase B1	70% (v/v) - 13 mL ↓	13% (v/v) - 2,5 mL	13% (v/v) - 2,5 mL	4% (v/v) - 0,6 mL	12,22
Fase B2	77% (v/v) - 19 mL ↑	10% (v/v) - 2,5 mL	10% (v/v) - 2,5 mL	3% (v/v) - 0,6 mL	14,62
Fase B3	73% (v/v) - 15 mL ↓	12% (v/v) - 2,5 mL	12% (v/v) - 2,5 mL	3% (v/v) - 0,6 mL	13,02
Fase B4	74% (v/v) - 16 mL ↓	12% (v/v) - 2,5 mL	12% (v/v) - 2,5 mL	2% (v/v) - 0,6 mL	13,45

Tabla 3.4. *Modificación de concentración de los componentes de Fase B. Con flechas se señala si se aumentó o disminuyó la concentración respecto de la concentración original.*

Se puede observar que, al aumentar la concentración de cloroformo, se disminuye el factor de retardo de la Fosfatidilcolina y Fosfatidiletanolamina. En el caso contrario, al disminuir el porcentaje de cloroformo en la solución eluyente, se aumenta notablemente el tiempo de retardo de los compuestos. En ambos casos extremos, no se logra separar la Fosfatidilcolina y de la Fosfatidiletanolamina. Por otro lado, cuando las variaciones de la composición de las fases son menores (B3 y B4) las corridas en las placas son similares también. No obstante, es importante resaltar que aún frente a pequeños cambios en la composición del componente mayoritario, se observan cambios en la distancia recorrida por los diferentes compuestos.

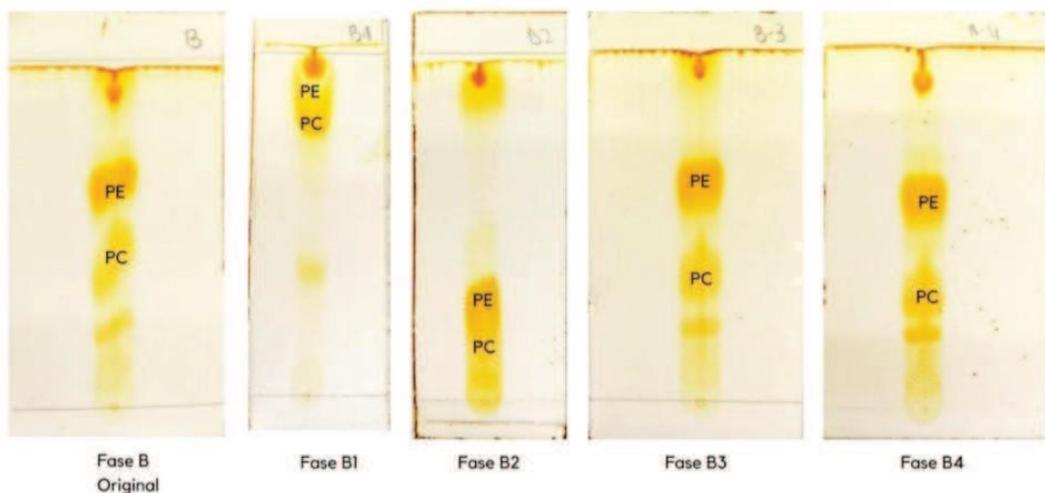


Figura 3.3: *Corridas TLC de AIM en de Fase B original, Fase B1, Fase B2, Fase B3 y Fase B4.*

3.4. Efecto de la condición ambiente y el manipuleo en la composición de la fase móvil

Según se describió en el punto anterior, la composición relativa de los diferentes componentes de la fase móvil impactan significativamente en el desarrollo del análisis. En este sentido, es de prever que se debe ser extremadamente cuidadoso no solo en la preparación de la fase móvil sino que además en el manipuleo y la conservación de la misma en el tiempo.

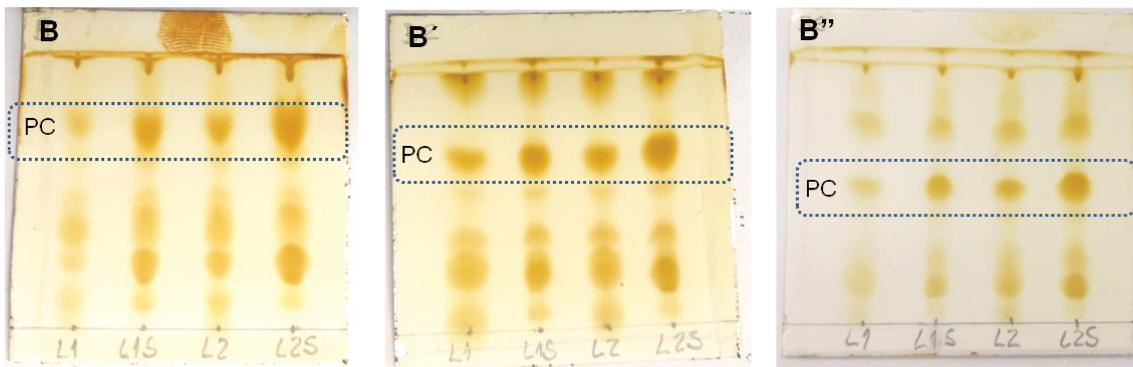


Figura 3.4: *Corridas TLC de las mismas muestras (L1 / LIS / L2 / L2S) con Fase B, B' y B'', preparadas con la misma concentración, afectadas por la temperatura ambiente y el manipuleo*

En la Figura 3.4 se muestran las placas correspondientes a las corridas de las mismas muestras empleando en teoría la misma “Fase móvil B”, las cuales fueron preparadas con idénticas concentraciones. La placa de la izquierda corresponde al análisis realizado con una “Fase B” preparada el día anterior donde se observa que las manchas correspondientes a la PC (fosfatidilcolina) están cercanas al final de la placa. Esas mismas muestras son corridas nuevamente con una Fase B (placa del centro de la figura, B') preparadas el mismo día pero utilizada con anterioridad en otras corridas. En ese caso se observa que las manchas correspondientes a la PC presentan un factor de retardo menor, pero también se observan manchas de otros compuestos no muy bien resueltos cercanos a la línea del final de la corrida (parte superior de la placa). Finalmente, las muestras se corren con una Fase B recién preparada (placa a la derecha de la figura, B'') y se observa que las manchas correspondientes a la PC se encuentran en la zona central de la placa y se identifican el resto de los compuestos esperables para esas muestras.

Estas experiencias ratifican la importancia del efecto de las composiciones relativas de los componentes de la fase móvil en el desarrollo del análisis, donde las condiciones ambientales, fundamentalmente la temperatura del laboratorio, y el grado de manipulación de la fase, pueden producir la evaporación parcial de sus componentes, generando una variación de la composición de la fase móvil y por lo tanto afectando la resolución del análisis.

3.5. Efecto del volumen de fase móvil

Previo al estudio del efecto de la composición de la fase móvil, se había determinado que no se obtenía buena repetitividad en los análisis. Se realizaron varias corridas análogas con Fase B según la norma AOCS [8] denominada “original”, y se obtuvieron los perfiles mostrados en la Figura 3.5. Es evidente que no se obtienen cromatogramas con factores de retardo muy similares.

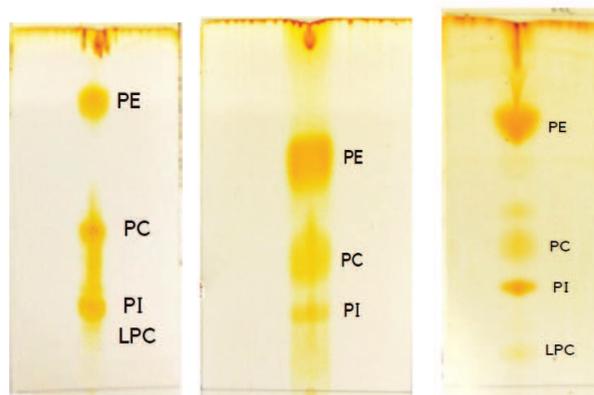


Figura 3.5: Corridas TLC de AIM en de Fase B original.

Para resolver esta dificultad, se analizó una variable adicional que es la cantidad de solvente (Fase B en este caso) colocado en las distintas cubetas de análisis. Se realizan experiencias sistemáticas colocando diferentes cantidades de solvente en la cubeta, y luego se toma el tiempo de cada corrida, es decir, el tiempo necesario hasta que el solvente atraviesa toda la placa de TLC. Se observa que a mayor cantidad de solvente (teniendo siempre la precaución de no sobrepasar el punto de siembra), menor es el tiempo de la corrida, y mayor repetitividad se logra. Esto es debido a que cuando la cantidad del solvente en la cubeta es baja, se evaporan selectivamente los componentes de la Fase B, cambiando su concentración progresivamente en el tiempo,

haciendo así que los compuestos de la muestra salgan a tiempos diferentes de lo esperado. Es por ello que se presta especial atención al volumen de solvente en la cubeta para obtener repetitividad en las corridas y además que todas ellas resulten comparables entre sí. Este es un ejemplo de la importancia de este estudio, dado que la norma no realiza ninguna advertencia respecto de la importancia de este parámetro. Al respecto, la norma dice: “Desarrolle la placa en un tanque conteniendo el solvente de TLC hasta que el solvente viaje la distancia completa”.

3.6. Conclusiones

Teniendo en cuenta que el análisis en una dimensión permite resolver el compuesto de interés, que es la fosfatidilcolina relativo al resto de los fosfolípidos, y en base a las experiencias realizadas, se decide adoptar como técnica de análisis, la técnica de (TLC) en una dimensión con la fase compuesta por Cloroformo-Metanol-Ácido acético-Agua destilada (75:11:11:3 v/v) teniendo especial precaución de preparar la fase móvil al momento de utilizarla para evitar cambios de composición, en los tiempos de corridas y en el volumen de solvente a utilizar en la cubeta. De esta forma se logra aumentar la repetitividad de las corridas.

3.7. Referencias

- [1] Direct determination of single phospholipids (PE, phosphatidylethanolamine; PA, phosphatidic acid; PI, phosphatidylinositol; PC, phosphatidylcholine) in lecithin by high-performance liquid chromatography, AOCS Ja 7b-91
- [2] Concentración de fosfolípidos en lecitina por cromatografía en capa delgada, AOCS Ja 7-86
- [3] J.D. Turner, G. Rouser, Anal. Biochem. 38 (1970) 423
- [4] G. Wang, T. Wang, J. Agric. Food Chem. 58 (2010) 2554.
- [5] J. Aloisi, B. Fried, J. Sherma, J. Liq. Chromatogr. 14 (1991) 3269
- [6] F. Vitiello, J.P. Zanetta, J. Chromatogr. 166 (1978) 637.
- [7] Stephanie Krüger, Laura Burmann, and Gertrud E Morlock, J. Agric. Food Chem. (2015) 63, 2893–2901
- [8] Norma AOCS JA 7-86
- [9] C. Reichardt, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. (1979) 18, 98-110
- [10] Snyder en: High-Performance Liquid chromatography (C. Horvath ed.), Vol. 3, Academic Press, New York

Capítulo 4

PURIFICACIÓN DE FOSFATIDILCOLINA

4. PURIFICACIÓN DE FOSFATIDILCOLINA

En este capítulo se estudia la obtención de fosfolípidos purificados, poniendo especial énfasis en la extracción de la fosfatidilcolina del residuo del desgomado de aceites. Los parámetros o condiciones de extracción que se estudiaron fueron las proporciones de materia prima, de solvente, los tipos y la combinación de solventes a utilizar y el orden en que se emplean.

4.1. Introducción

Una alternativa interesante para la separación selectiva de los fosfolípidos, es la combinación de disolución y extracción con diferentes solventes. Algunos reportes indican que, según el solvente usado, se puede disolver preferentemente alguno de los fosfolípidos.

Para la planificación de las experiencias, se tuvieron en cuenta diversas fuentes de información. Por un lado, según reportan Zhang y cols. [1], se lograron separaciones de fosfatidilcolina utilizando en primer lugar acetona y luego etanol 96 %, con una relación fosfolípido:acetona de 1:10 g/mL. Por otro lado, Liu y cols. [2] presentan resultados satisfactorios en uso de isopropanol como solvente para la separación. Cabezas [3] reporta extracciones similares, pero utilizando etanol de 100% de pureza.

También se reporta en bibliografía el uso de mezcla de solventes. Así, por ejemplo, la utilización de mezclas de etanol/isopropanol extrae preferentemente la PC [4], mientras que una mezcla de etanol/cloroformo extrae simultáneamente PC y PE [5].

Por lo que, con base en la bibliografía consultada, es que se diagramaron diversas experiencias de extracción, considerando además variaciones en las temperaturas y en el orden en que se usan los solventes, entre otras.

Estos resultados abren una línea amplia de trabajo, dado que claramente demuestran que, cambiando la polaridad del solvente en un ajuste fino, se puede lograr mejorar la selectividad de la disolución selectiva de los fosfolípidos.

4.2. Metodología

Para las experiencias se siguieron dos líneas generales de extracciones, que se esquematizan en Figura 4.1. Por un lado, se realizan extracciones comenzando por dos lavados de acetona, y posteriormente un tercer lavado con un solvente alcohólico. Por otro lado, se efectuaron experiencias de extracción, comenzando por un lavado con un solvente alcohólico, y luego dos lavados con acetona. Como solventes alcohólicos se usaron: metanol e isopropanol, ambos de calidad pro-análisis, y etanol 96 %. En las secuencias indicadas en la Figura 4.1, las muestras identificadas como L1S, L2S, L3S, corresponden a las experiencias en las que en la última etapa de extracción se empleó metanol, etanol e isopropanol respectivamente, y la letra “S” indica que se trata de la fracción soluble en dicho alcohol. Las muestras identificadas como L1, L2, L3, corresponden a la fracción insoluble en alcohol en forma análoga a lo mencionado en el caso de la fracción soluble. De manera similar, las muestras indicadas como L4S, L5S, L6S, L4, L5 y L6 corresponden a las fracciones solubles e insolubles en los alcoholes empleados en la primer etapa de extracción, siendo metanol, etanol, e isopropanol respectivamente, seguidas por extracciones con acetona. Las muestras L7S, L8S, L7 y L8 corresponden a las experiencias en las que se usó etanol anhidro y etanol 96% con una relación lecitina:alcohol = 1:3, mientras que en las otras experiencias esta relación fue 1:10.

Las extracciones se efectúan en un recipiente tipo batch con reflujo y temperaturas de 5°C y 60°C (dependiendo del solvente), durante distintos tiempos, extendiéndose como máximo 30 minutos. Se realizaron hasta 3 etapas de extracción. Finalizada cada etapa se hace la separación de fases por centrifugación y posteriormente se seca el solvente. Las distintas fracciones son analizadas por TLC y posteriormente se procesan las placas cromatográficas con el programa ImageJ, tal como se describió en el Capítulo 2 de Metodología.

4.3. Resultados y Discusión

4.3.1. Composición de la lecitina

En una primera experiencia se realizaron dos etapas de extracción con acetona a una lecitina cuya composición era 69,8 % de fosfolípidos, menos del 1 % de agua y 30

% de aceite. Con este solvente es de esperar que se logre la extracción solamente de los lípidos neutros y queden los fosfolípidos en forma de precipitado dado su insolubilidad en la acetona. Para estas experiencias se pesaron 4 g de lecitina en un tubo de centrifuga con tapa y se le agregó 45 mL de acetona a 5 °C. Se mezcla de manera tal de favorecer el contacto de la acetona con la muestra y se lleva a un baño a 5 °C por 15 minutos. Finalizado este tiempo se extrae del baño y se lleva a centrifuga de manera tal de separar la fase precipitada, rica en fosfolípidos, de la fase acetona que se lleva el aceite y el agua. La fase precipitada es separada y se le realiza nuevamente una extracción con acetona como ya se describió. Por último, se deja el tubo de centrifuga abierto en estufa a 80 °C hasta lograr un peso constante, logrando así que se evapore la acetona residual presente en el precipitado.

Por diferencia de peso entre la masa de lecitina inicial y el residuo recuperado se logró determinar que efectivamente la lecitina de partida posee un 69 % de fosfolípidos. Para determinar la distribución de fosfolípidos se realizó una corrida cromatográfica utilizando la técnica de cromatografía en placa delgada (TLC) en una dimensión con fase compuesta por Cloroformo-Metanol-Ácido acético-Agua destilada (75:11:11:3 v/v) denominada Fase B en la Norma AOCS JA 7-86 [6] desarrollada en el capítulo anterior. En la Figura 4.2 se muestra la placa cromatográfica una vez revelada junto a la descomposición en picos de las “manchas”, realizada con el software ImageJ.

Se observa de la Figura 4.2. que los fosfolípidos mayoritarios son la fosfatidilcolina y la fosfatidiletanolamina, lo cual se puede ver por las “manchas” de mayor tamaño y coloración. En menor proporción se encuentran el fosfolípido parcialmente hidrolizado de la PC (lisofosfatidilcolina, LPC), fosfatidilinositol y el ácido fosfatídico. Notar que la señal rotulada como LPC presenta un hombro en el lado derecho del pico, que corresponde a la LPE, tal como se mostró en el Capítulo 3. Del análisis de los picos obtenidos con el uso del programa ImageJ, se determinó que la lecitina de partida posee una distribución de fosfolípidos como se muestra en la Tabla 4.1. Tanto la PC como la PE están en concentraciones similares, y en menor medida encontramos el PI, PA y los lisofosfolípidos. Este primer resultado nos da información de la composición de la materia prima que se utiliza en el estudio de concentración de fosfatidilcolina por extracción con solventes utilizando diferentes estrategias.

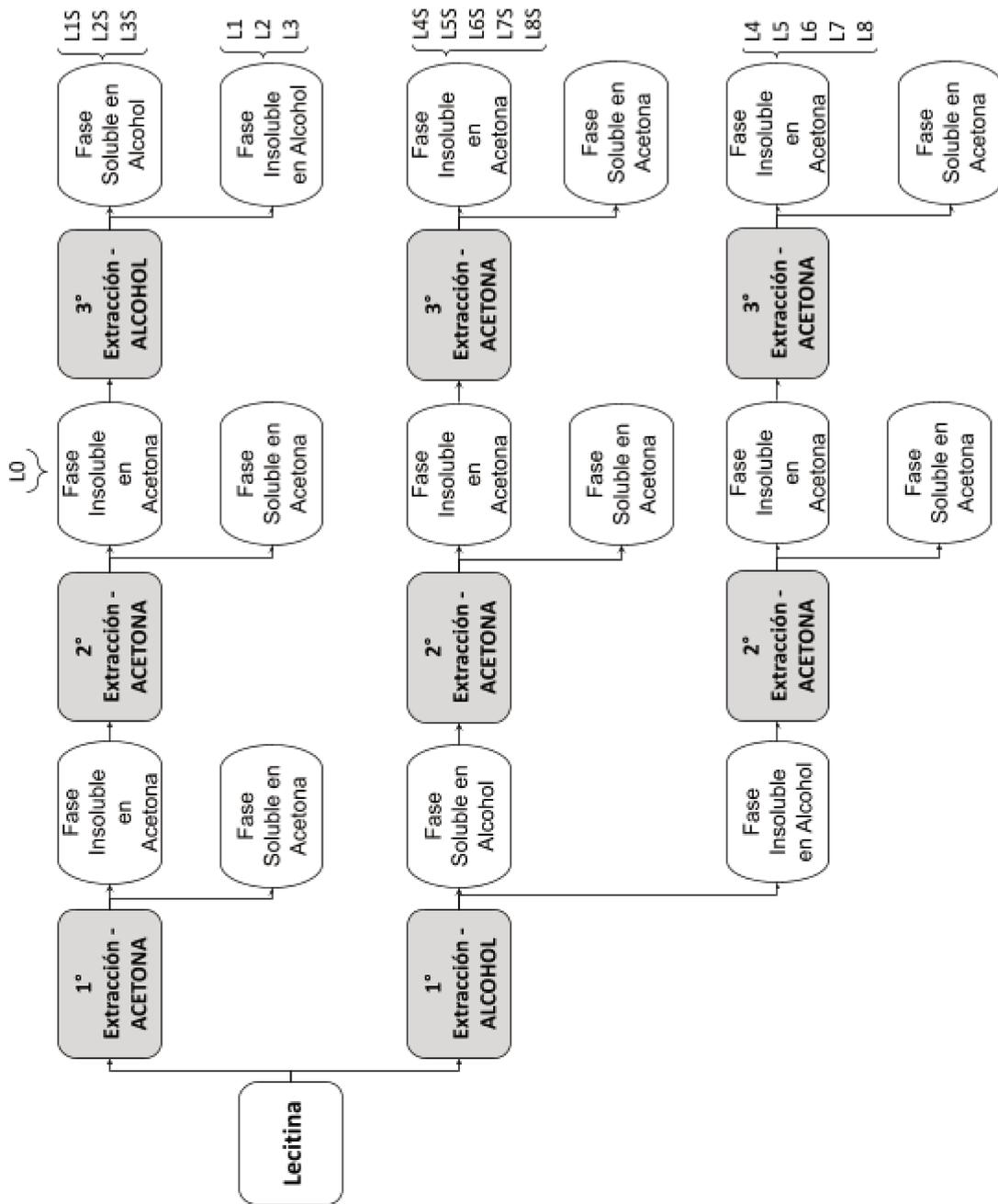


Figura 4.1 - Resumen de experiencias de extracción realizadas a partir de lecitina.

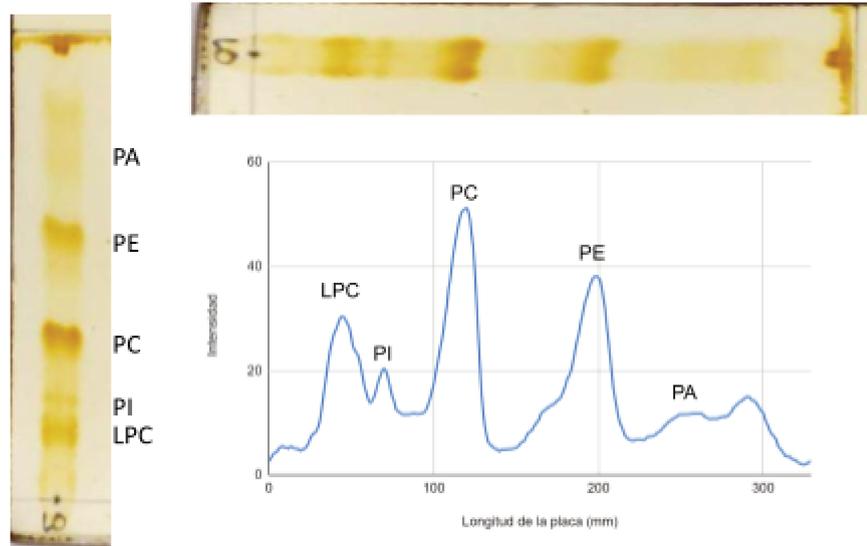


Figura 4.2: Placa cromatográfica revelada (L0) con su correspondiente descomposición en picos, realizado con el software ImageJ

Fosfolípido	Composición porcentual %
Fosfatidilcolina (PC)	29
Fosfatidiletanolamina (PE)	28
Liso-Fosfatidilcolina (LPC)	18
Ácido Fosfatídico (PA)	8
Fosfatidilinositol (PI)	7
Otros Fosfolípidos	10

Tabla 4.1. Composición de fosfolípidos de la Lecitina utilizada.

4.3.2 Análisis de las experiencias de extracción

4.3.2.1 Extracciones acetona-acetona-alcohol

Como estrategia de purificación de la fosfatidilcolina presente en los fosfolípidos provenientes de la soja, se siguió la secuencia indicada en la Figura 4.1 en la que se realizan extracciones secuenciales con acetona, acetona y alcohol. En las dos primeras etapas con acetona se extraen los lípidos neutros. Las extracciones se realizaron como se explicó en las experiencias preliminares. Posteriormente, se tomó el

precipitado obtenido a partir de la dos etapas de extracción con acetona, de ahora en más llamado AIM (Acetone Insoluble Matter), y se le realizó una tercera etapa de extracción con metanol (MeOH), etanol 96 % (EtOH), o isopropanol (IPA), siguiendo la nomenclatura L1, L2 o L3 respectivamente. Para las experiencias de extracción con los alcoholes, éstos se agregaron en una relación 1:10 g/mL (PL:Solvente) y la extracción se prolongó por 30 min a 60 °C en tubos de centrifuga.

Se observaron diferencias marcadas al mezclar los diferentes alcoholes con el extracto de lecitina (AIM), en lo referido al mezclado de las fases. La situación más favorable es que el solvente logre dispersar la emulsión de manera de facilitar la extracción de los componentes solubles en ese alcohol. A continuación se ordenan los alcoholes según la facilidad con la que dispersaron la muestra, en orden decreciente indicando en primer lugar el que lo hizo con mayor facilidad:

Metanol > Isopropanol > Etanol 96%

Es decir, el metanol fue el que dispersó más fácilmente la muestra (lecitina), seguido del isopropanol, que inicialmente presenta cierta resistencia, pero finalmente logra la dispersión. En cambio, con el etanol al 96 % esta operación resultó difícil. En la Foto 4.1.A se muestran los tubos con las extracciones con cada uno de los alcoholes (de izquierda a derecha metanol, etanol, isopropanol) luego de centrifugar.

Notar que en el caso del metanol, la fase líquida es la más coloreada, lo que indica que se han extraído compuestos que quedaron en la fase sólida insoluble formadas con los otros dos alcoholes. La Foto 4.1.B muestra las fases sólidas separadas luego de la centrifugación. Si bien no se aprecia perfectamente en la foto, en el caso del sólido insoluble que queda luego de la extracción con metanol, tiene una apariencia de arenilla y de color más claro que los otros dos extractos, mientras que en el caso del extracto del etanol es un sólido gomoso, y la experiencia con isopropanol tiene un comportamiento intermedio.

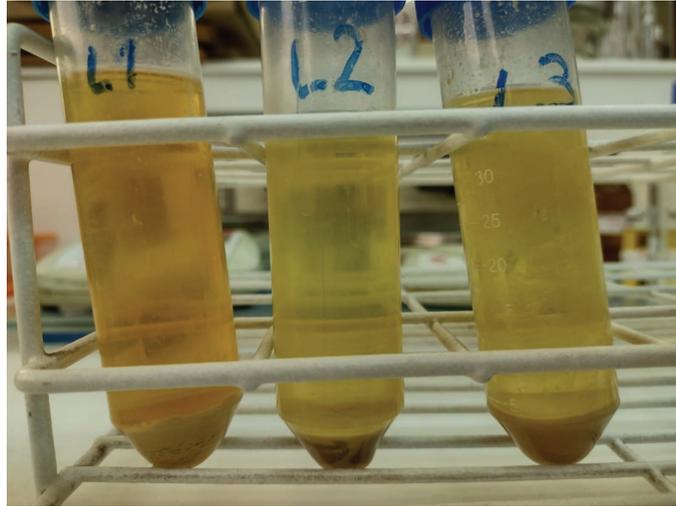


Foto 4.1.A Etapa de extracción con cada uno de los alcoholes (de izquierda a derecha metanol, etanol, isopropanol) a la lecitina extraída previamente con acetona.

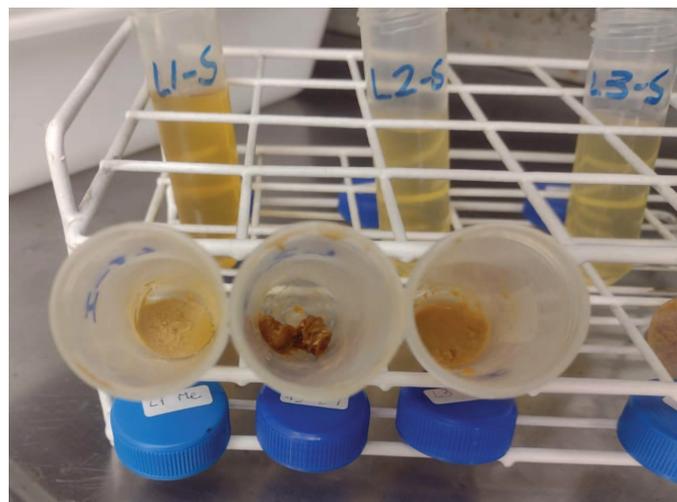


Foto 4.1.B Fracciones insolubles luego de la extracción con los diferentes alcoholes (de izquierda a derecha, metanol, etanol e isopropanol).

Esta diferencia en la mezcla de los fosfolípidos está relacionada con las polaridades de los solventes. La polaridad del metanol es de 0.762, la más alta de los tres alcoholes. Esto en cierta forma permitiría justificar el comportamiento observado. No obstante, éste no es el único parámetro que interviene en desestabilizar la emulsión. La polaridad del etanol puro es 0,654, por lo que la del etanol 96% será levemente superior a eso, y la del isopropanol es de 0.546. Es decir que en este caso, no se correlaciona la polaridad con la facilidad de dispersión. Hay que tener en cuenta

que la presencia de 4% de agua en el etanol, puede estar interactuando con los fosfolípidos al igual que en la etapa de desgomado acuoso.

Luego de las etapas de extracción, independientemente del alcohol utilizado, se obtuvieron dos fases que son separadas luego de ser centrifugadas: una fase líquida y una fase sólida, tal como se mostró en las Fotos 4.1.A y B. A ambas fases se les evapora el alcohol aplicando temperatura y vacío. De la fase líquida se obtiene una mezcla de mayor viscosidad y apariencia aceitosa. Ambas muestras se caracterizaron.

Para el análisis de las fases se utilizó la técnica de Cromatografía en Placa Delgada (TLC) en una dimensión. Para ello se empleó la fase móvil denominada Fase B, compuesta por Cloroformo-Metanol-Ácido acético-Agua destilada (75:11:11:3 v/v). En todos los casos las muestras se disolvieron en hexano en una relación 1:100.

En la Figura 4.3 se muestran las placas cromatográficas de la fracción soluble obtenida luego de la evaporación del alcohol, siendo la primera de la izquierda correspondiente a la experiencia con MeOH, la que le sigue con EtOH 96% y la última con IPA. Además se analizó un estándar de PC para garantizar la asignación de dicho pico.

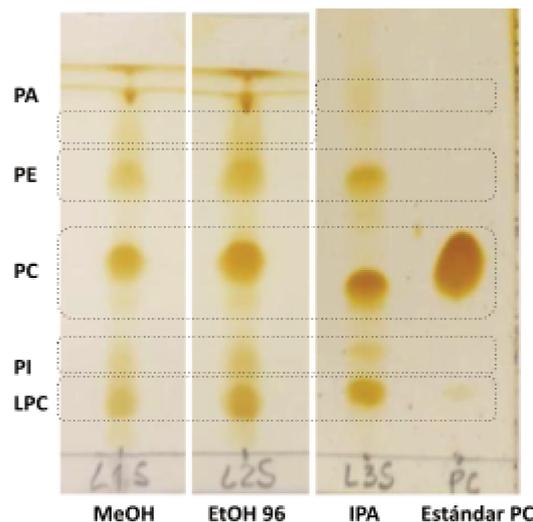


Figura 4.3. Placas cromatográficas de la fase soluble obtenida luego de la evaporación del alcohol. El orden de las experiencias es el siguiente: MeOH, EtOH96, e IPA (L1S, L2S, L3S).

Para poder determinar la concentración de los fosfolípidos buscados se realiza la deconvolución de las imágenes en picos.

En las Figuras 4.4.A y Figura 4.4.B se muestran los picos obtenidos al procesar las placas con el software ImageJ.

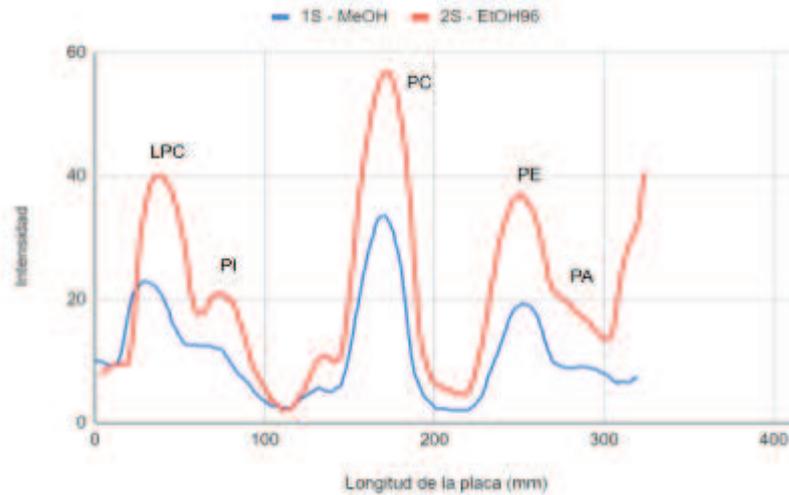


Figura 4.4.A. Picos obtenidos con el programa ImageJ a partir de placas cromatográficas de la fase obtenida luego de evaporación del alcohol (MeOH (L1S), EtOH 96 (L2S)).

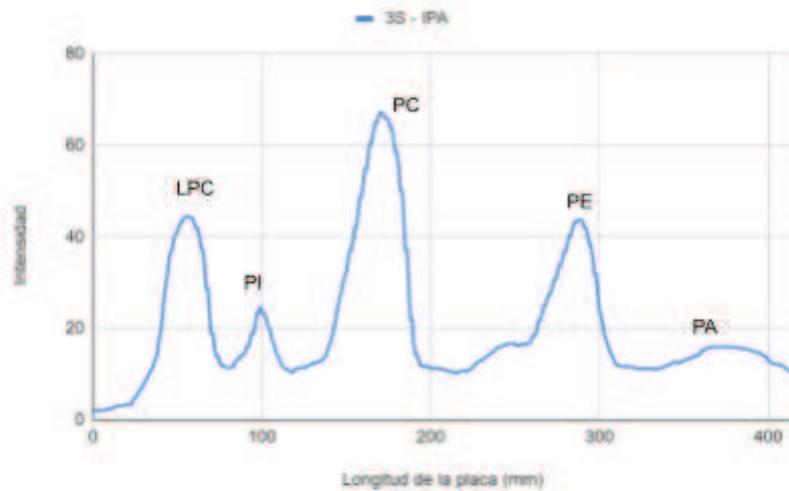


Figura 4.4.B. Picos obtenidos con el programa ImageJ a partir de placas cromatográficas de la fase soluble obtenida luego de la evaporación del alcohol (IPA,(L3S)).

Con las áreas de los picos, se obtienen las cantidades relativas de cada componente. En la Tabla 4.2, se muestran dichos valores. Se logró concentrar hasta un 38 % la PC usando IPA, un 35% con etanol 96%, y hasta un 34% con metanol. Estas concentraciones no difieren significativamente al 29% PC que posee la materia prima de partida.

Experiencia	%LPC	%PI	%PC	% PE	% Otros PLs
Materia prima	18%	7%	29%	28%	18%
Metanol (L1S)	25%	9%	34%	22%	10%
Etanol 96% (L2S)	21%	10%	35%	22%	12%
Isopropanol (L3S)	19%	8%	38%	23%	13%

Tabla 4.2. Composición relativa de PC, de la fase obtenida luego de evaporación del alcohol

Para analizar la fracción insoluble en alcohol, se diluyó la muestra en hexano en una relación 1:100, se sembró en la placa cromatográfica, la cual se corrió con la fase móvil B y luego se reveló en una cámara con vapores de yodo. Estas muestras corresponden a las indicadas como L1, L2 y L3 en la Figura 4.1.

En la Figura 4.5, se presentan las corridas cromatográficas de las muestras obtenidas en las experiencias en que se usó metanol , etanol 96 y por último isopropanol.

Los cromatogramas obtenidos del procesamiento de las placas con el programa ImageJ se muestran en la Figura 4.6. La integración de las señales permite obtener las cantidades relativas de cada fosfolípido.

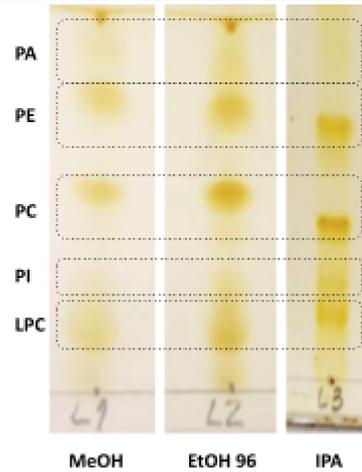


Figura 4.5 Placas cromatográficas de la fase precipitada obtenida luego de la evaporación del alcohol. El orden de las experiencias es el siguiente: MeOH, EtOH 96, e IPA (L1, L2, L3)

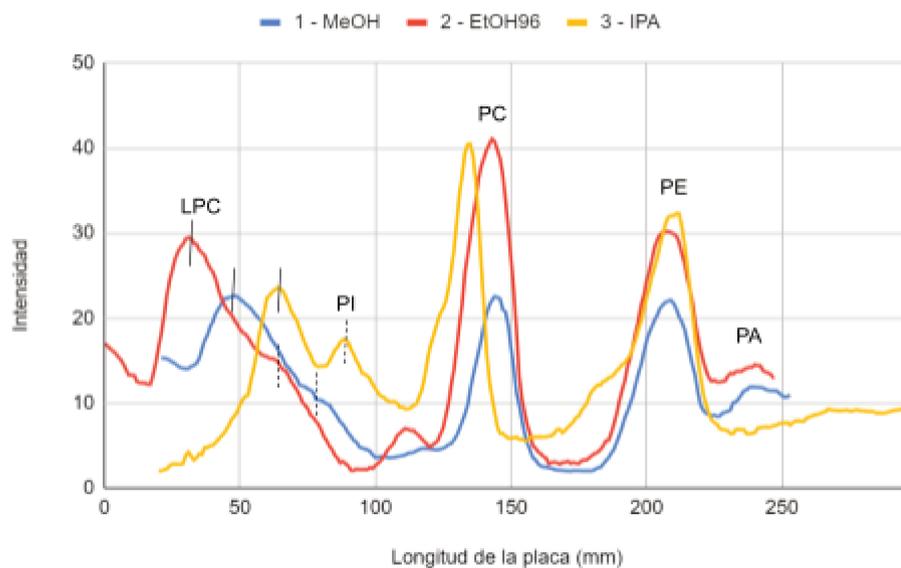


Figura 4.6 Cromatograma obtenido con el programa ImageJ a partir de placas cromatográficas de la fase precipitada obtenida luego de evaporación del alcohol (MeOH (L1), EtOH 96 (L2), e IPA (L3)).

En la Tabla 4.3 se resumen las concentraciones de cada uno de los fosfolípidos. En los tres casos se redujo la de PC, lo que es consistente con la observación del aumento de la proporción de este fosfolípido en la fase soluble, como se mostró en la Tabla 4.2. Este comportamiento es más marcado cuando se utilizó metanol como solvente de extracción.

Experiencia	%LPC	%PI	%PC	% PE	% Otros PLs
Materia prima	18%	7%	29%	28%	18%
Metanol (L1)	31%	12%	19%	24%	14%
Etanol 96% (L2)	25%	10%	26%	25%	14%
Isopropanol (L3)	17%	12%	24%	26%	21%

Tabla 4.3 Composición relativa de PC, de la fase precipitada obtenida luego de la evaporación del alcohol.

En conclusión, al combinar tres etapas de extracción—primero dos con acetona y luego una con un solvente alcohólico—los resultados en la purificación de la PC no fueron satisfactorios. En la fase soluble en alcohol, donde se esperaba concentrar la PC, no se obtuvieron valores altos. Además, no se observaron diferencias significativas entre los distintos solventes utilizados.

Esto se puede explicar teniendo en cuenta que en este procedimiento, inicialmente se purifican los fosfolípidos, extrayendo los lípidos neutros. Esto conduce a una interacción más fuerte entre ellos lo que hace más difícil su separación. Es de recordar que los fosfolípidos son moléculas anfifílicas, con una parte polar y una no polar, que se encuentran formando micelas con el agua o el aceite. Es probable que al extraer estos compuestos, los fosfolípidos sigan formando estas estructuras con la parte no polar de otro de los fosfolípidos. Con base en lo ya expuesto, en las siguientes experiencias se invertirá el orden de las etapas de extracción.

La Figura 4.7 muestra los análisis por TLC de las muestras L0 y las generadas en las experiencias L1, L2 y L3, tanto en la fracción insoluble (Figura 4.7.A) como en la soluble (Figura 4.7.B).

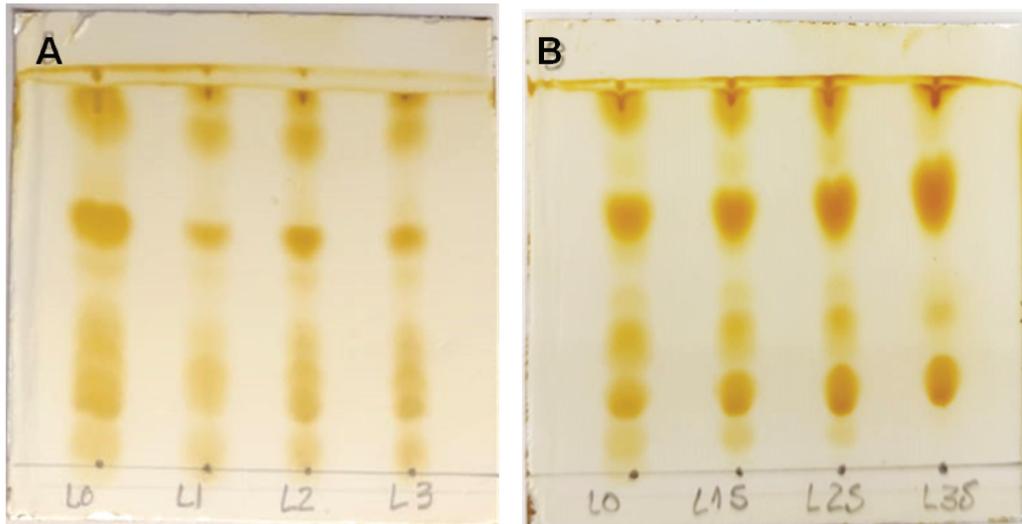


Figura 4.7: Análisis por TLC. **(A)** muestras L1, L2, L3; **(B)** muestras L1S, L2S, L3S; en ambas figuras se incluye el perfil de la muestra L0.

La muestra L3S, fracción soluble en el IPA en la secuencia acetona-acetona-alcohol, presenta en su perfil de TLC a la señal de la PC más intensa y grande que en las muestras L1S y L2S, así como también L3S presenta menor presencia de otras señales indicando que efectivamente la extracción de PC con el isopropanol es mejor que con metanol y etanol. En correspondencia con esta observación, puede verse que el cromatograma de la fracción insoluble obtenida con el isopropanol (L3) presenta una señal pequeña de PC y una importante contribución de otros compuestos (Figura 4.7.A). Por otro lado, en la observación de la Foto 4.1.B, se destacó que la fase soluble obtenida con metanol es más coloreada que con los otros alcoholes. En acuerdo con esta observación, puede verse en las placas TLC, que el perfil de la muestra L1S presenta más señales que en las correspondientes a la extracción con etanol (L2S) y particularmente respecto de la correspondiente al isopropanol (L3S). En el mismo sentido, el cromatograma de la fracción insoluble obtenida en la extracción con metanol (L1) presenta menos señales que las otras dos, y el correspondiente a la extracción con isopropanol, es la que presenta un perfil con más señales (L3, Figura 4.7.A).

Este análisis permite ver que existe consistencia entre los resultados numéricos obtenidos, y las observaciones cualitativas realizadas en cada caso durante las extracciones.

4.3.2.2 Extracciones alcohol-acetona-acetona

Utilizando la misma muestra de lecitina se procedió a hacer una primera extracción con alcohol seguida de otras con acetona. Esta lecitina posee una composición 69% PL, 1% agua y 30% de aceite; y una distribución porcentual de fosfolípidos indicada en la Tabla 4.1.

La primera etapa de extracción se realizó dosificando el alcohol en una relación lecitina:alcohol 1g:10mL. El tubo con la muestra y el alcohol se colocó en un baño a 60 °C por 30 min. Se observan diferencias marcadas en el comportamiento referido a la mezcla y a la dispersión de la emulsión al contactar la lecitina en primera instancia con los diferentes alcoholes. Análogamente a lo observado antes, el metanol logra una rápida dispersión de la lecitina, con mucha dificultad en el caso del etanol 96%, y con un comportamiento intermedio en el caso del isopropanol. En la Foto 4.2.A se pueden observar los tubos durante la extracción alcohólica antes de centrifugar, y en la Foto 4.2.B se muestran las fracciones insolubles luego de la centrifugación y separación se la fracción alcohólica. En ambas fotos se puede notar que para la extracción con etanol 96% (tubo central de las imágenes) la fracción insoluble presenta un color más oscuro y una apariencia más gomosa que las otras dos experiencias.



Foto 4.2.A Extracción de lecitina con cada uno de los alcoholes (de izquierda a derecha metanol, etanol, isopropanol).

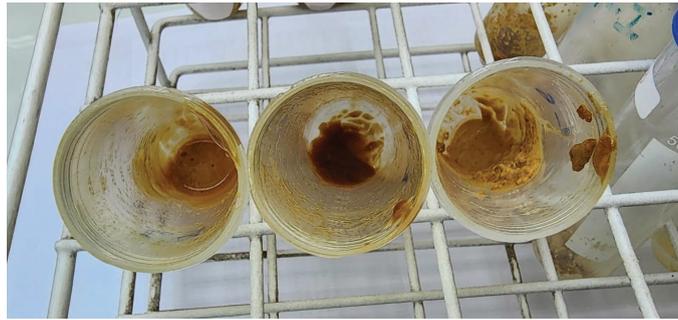


Foto 4.2.B *Fracciones insolubles luego de la extracción con los diferentes alcoholes (de izquierda a derecha, metanol, etanol e isopropanol).*

A ambas fracciones, la soluble y la insoluble, se les evaporó el alcohol en vacío y temperatura. En la Foto 4.3 se observan las fracciones solubles en alcohol durante la etapa de evaporación. Finalizada esta etapa las muestras presentan mayor viscosidad y apariencia oleosa. Posteriormente, se procedió a realizarles dos etapas consecutivas de extracción con acetona a cada fase. Para estas experiencias se le agregó 45 mL de acetona a 5 °C a cada una de las muestras, se homogeneizó y se llevó a un baño a 5 °C por 15 min. Finalizado este tiempo se extrae del baño y se lleva a centrífuga de manera tal de separar fases, se descarta la fase líquida (rica en acetona), y al precipitado se le realiza nuevamente una extracción con acetona como ya se describió. Por último, se evaporó la acetona mediante estufa a 80 °C hasta lograr peso constante.

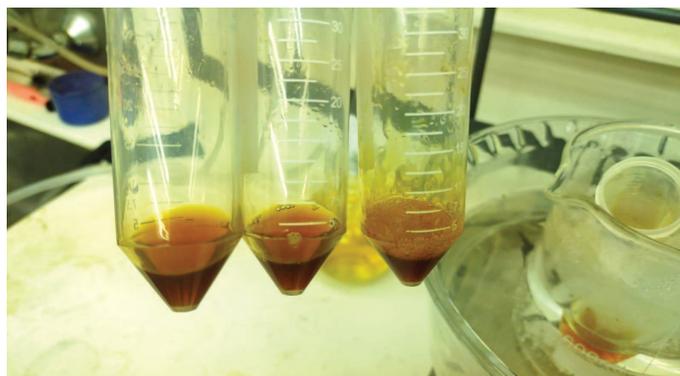


Foto 4.3 *Fracciones solubles en los diferentes alcoholes durante la etapa de evaporación (de izquierda a derecha, isopropanol, etanol y metanol).*

El análisis de las fases obtenidas se realizó mediante TLC en una dimensión con las fases compuestas por Cloroformo-Metanol-Ácido acético-Agua destilada análogamente a las experiencias anteriores, y utilizando el software ImageJ para cuantificar las composiciones de los distintos fosfolípidos.

En la Figura 4.8, se muestran los cromatogramas obtenidos por TLC de la fase soluble en alcohol de cada experiencia, junto con una corrida de un estándar de PC. Además, se señala a qué componente corresponde cada huella. Allí se puede observar cómo en estas experiencias la marca correspondiente a la fosfatidilcolina es más intensa en color y extensa en área en relación al resto.

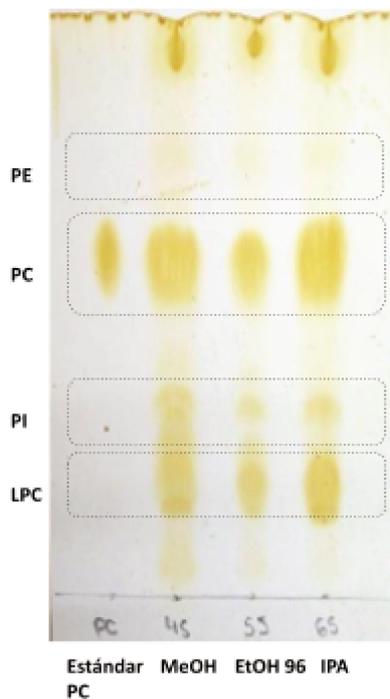


Figura 4.8. TLC de la fase soluble en alcohol, rica en Fosfatidilcolina. El orden de las experiencias es el siguiente: MeOH, EtOH 96, e IPA (L4S, L5S, L6S). Además se corrió un estándar de PC.

El procesamiento de la placa cromatográfica con el programa ImageJ se muestra en la Figura 4.9. Puede verse en estos cromatogramas que existe una deriva de la línea de base desde el inicio hasta la longitud en la cual comienza la señal de la PC. Incluso, en el caso del cromatograma obtenido en la experiencia L4S (primera extracción con metanol) no se alcanza a resolver la señal de la LPC y la del PI. Esta deriva no había sido observada en los cromatogramas de las fases solubles de la secuencia anterior, es decir cuando la secuencia de solventes usados fue acetona-acetona-alcohol. Esto sugiere que al usar el alcohol en la primera etapa se extraen algunos compuestos que luego no se definen en el cromatograma y generar esa deriva en la línea de base. Si bien esto

introduce una pequeña incertidumbre, se puede obtener conclusiones acerca de la diferente eficiencia de los alcoholes usados en la primera etapa de extracción.

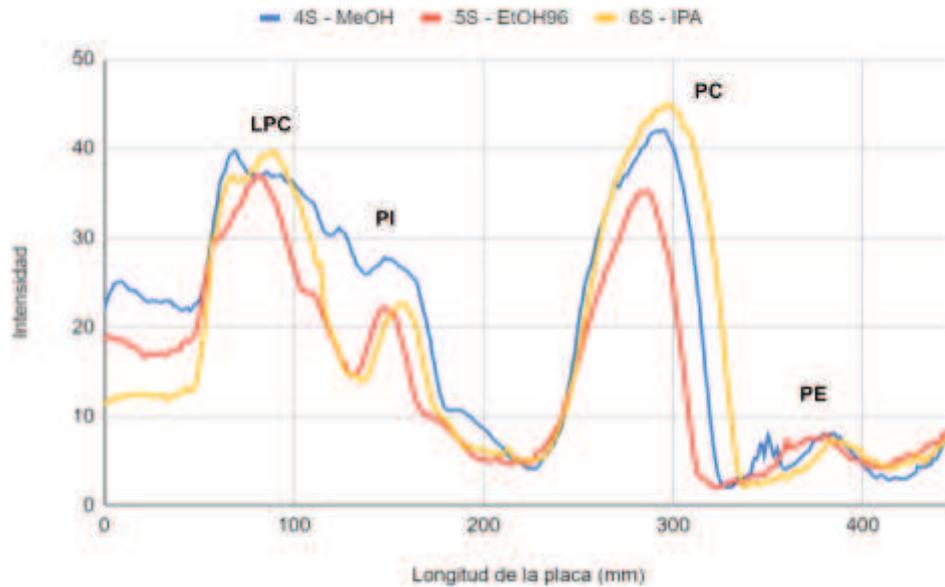


Figura 4.9 Picos obtenidos con el programa ImageJ a partir de placas cromatográficas de la fase soluble en alcohol, rica en Fosfatidilcolina.

Experiencia	%LPC	%PI	%PC	% PE	% Otros PLs
Materia prima	18%	7%	29%	28%	18%
Metanol (L4S)	33%	10%	38%	3%	16%
Etanol 96% (L5S)	40%	11%	36%	4%	9%
Isopropanol (L6S)	39%	10%	48%	3%	0%

Tabla 4.4 - Composición relativa de PC por experiencia, de la fase soluble en alcohol, rica en Fosfatidilcolina.

La Tabla 4.4 muestra las cantidades relativas de cada componente, una vez calculadas las áreas relativas de cada pico. Se observa que se lograron extractos más concentrados en PC cuando se combinaron una primera etapa de purificación

alcohólica con dos consecutivas de acetona. Al igual que las experiencias anteriores, el IPA logra la mayor extracción de la PC, siendo significativamente más alta que en el caso de las experiencias anteriores (extracciones con acetona seguidas de alcohol). Las extracciones con metanol y etanol 96% fueron menos selectivas a la extracción de PC.

El estudio se completó analizando la fase precipitada, la cual se espera que sea rica en PE y se lleve el resto de los fosfolípidos. Para ello se operó de igual forma a la fase soluble en alcohol. En la Figura 4.10 se muestran las placas cromatográficas de cada una de las experiencias.

Como se puede observar, efectivamente en esta fase se encuentran los mismos fosfolípidos presentes que en la materia prima de partida.

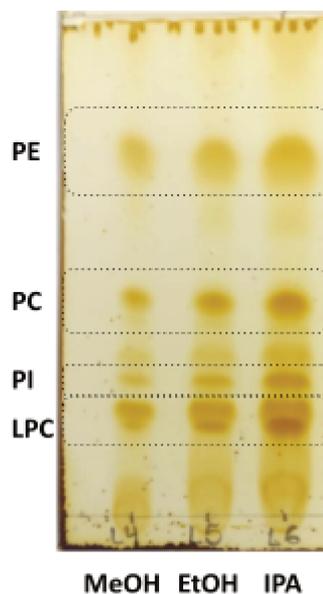


Figura 4.10. TLC la fase insoluble en alcohol. El orden de las experiencias es el siguiente:
MeOH, EtOH e IPA (L4, L5, L6)

En la Figura 4.11 y la Tabla 4.5 se muestran los resultados del procesamiento de las placas con ImageJ. Se puede observar cómo en las experiencias para la fase rica en PE, las concentraciones de fosfatidilcolina se mantienen en valores menores a la muestra original (28%).

En conclusión, las experiencias en las cuales la primera extracción consiste en una solución alcohólica como solvente, se logran mejores valores de pureza de PC que

en los casos en los que esta extracción se encuentra como tercer paso. El IPA es el solvente que extrae mayor cantidad de PC.

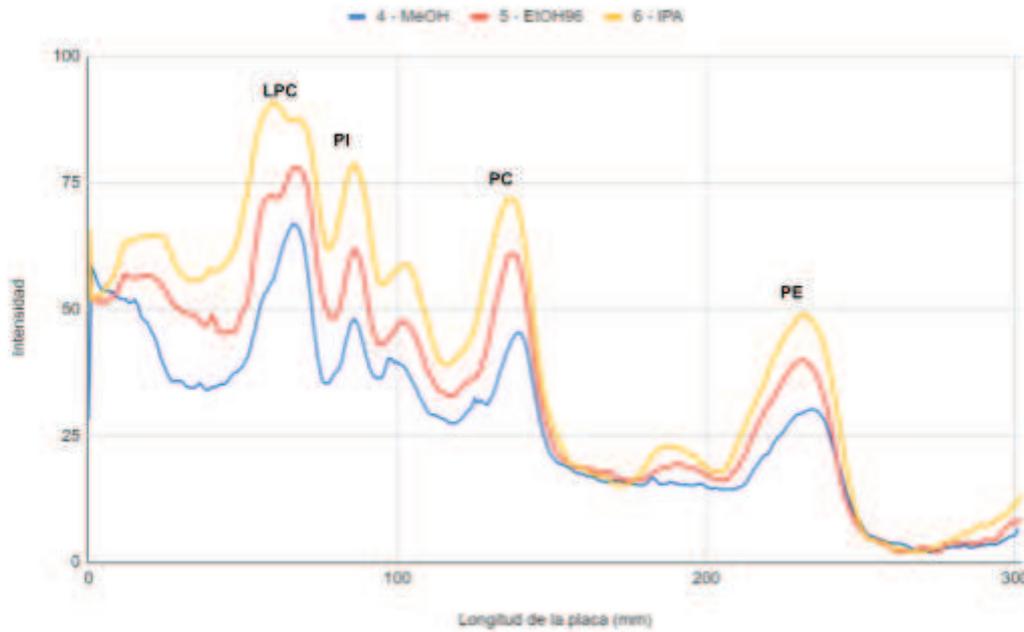


Figura 4.11 Picos obtenidos con el programa ImageJ a partir de placas cromatográficas de la fase insoluble en alcohol (L4, L5, L6).

Experiencia	%LPC	%PI	%PC	% PE	% Otros PLs
Materia prima	18%	7%	29%	28%	18%
Metanol (L4)	27%	10%	15%	26%	22%
Etanol 96% (L5)	27%	12%	16%	22%	23%
Isopropanol (L6)	23%	9%	16%	32%	20%

Tabla 4.5 Composición relativa de fosfolípidos por experiencia, de la fase insoluble en alcohol.

4.3.3. Extracción con etanol: efecto de la composición y la relación lecitina:alcohol

Si bien ya se mostró que el alcohol isopropanol es el alcohol que produce extractos más concentrados en PC, se pondrá énfasis en optimizar el uso del etanol. Esto debido al hecho de que este alcohol es de baja toxicidad, y es producido por fermentación de la biomasa. Por lo cual, en caso de poder utilizar etanol se estaría proponiendo un proceso amigable con el ambiente, ya que no solo se aprovecharía el residuo del desgomado del aceite, sino que también se usaría un solvente extractor renovable. Por otro lado, en primera instancia se trabajó con etanol 96% ya que, en el caso de realizar experiencias de extracción a partir de las gomas, éstas ya poseen un alto contenido de agua (alrededor del 40%) y no tiene sentido emplear un solvente anhidro. Por otro lado, al trabajar con lecitina el contenido de agua en el solvente extractor es un factor a ser considerado. En ese sentido, en función de los resultados mostrados, se estudian secuencias de extracción usando una primera etapa con etanol 96% y anhidro, y posteriores etapas de extracción con acetona como estrategia para la obtención de fracciones de fosfolípidos enriquecidas en PC.

Para ello se tomó una alícuota de la lecitina con la que ya se trabajó y se le agregó etanol en una relación lecitina:alcohol 1:3 m:v, ensayando tanto el alcohol 96% como el anhidro. Las extracciones se realizaron en tubo de centrifuga, a 60 °C por 30 min. Finalizado el tiempo de extracción, las muestras se centrifugaron y separaron fases, generando un sólido precipitado y la fase soluble en alcohol. A continuación, se le hicieron dos extracciones consecutivas de acetona a 5 °C, previa evaporación de alcohol, operando como ya se ha descripto anteriormente.

En la Figura 4.12, se muestran las placas cromatográficas del análisis de los extractos solubles en alcohol (A) y las gráficas obtenidas luego de su procesamiento con el software ImageJ (B).

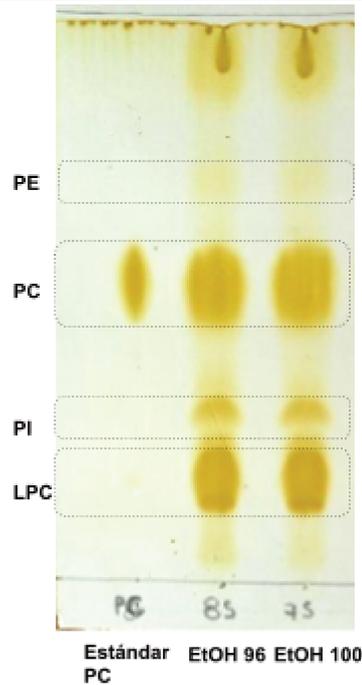


Figura 4.12.A. TLC la fase soluble en alcohol. El orden de las experiencias es el siguiente: EtOH 96%, EtOH 100% (L8S y L7S).

Se integran las señales obtenidas del procesamiento de las placas de TLC, y se calculan las cantidades relativas de cada componente, valores mostrados en la Tabla 4.6. Como se puede observar, efectivamente se lograron extractos más concentrados llegando a concentraciones de PC del 49%. Si bien no se ve mayor diferencia entre Etanol 96 y Etanol 100, sí se obtuvieron mejores resultados en este caso utilizando una relación muestra:solvente 1:3, a diferencia del estudio anterior en el que se utilizó una relación 1:10 y se logró concentrar hasta un 36%.

El estudio se completó analizando la fase precipitada, en la cual se encuentra una menor concentración de fosfatidilcolina. Para ello se operó de igual forma a la fase soluble en alcohol.

En la Figura 4.13, se muestran las placas cromatográficas del análisis de los extractos insolubles en alcohol (A) y las gráficas obtenidas luego de su procesamiento con el software ImageJ (B).

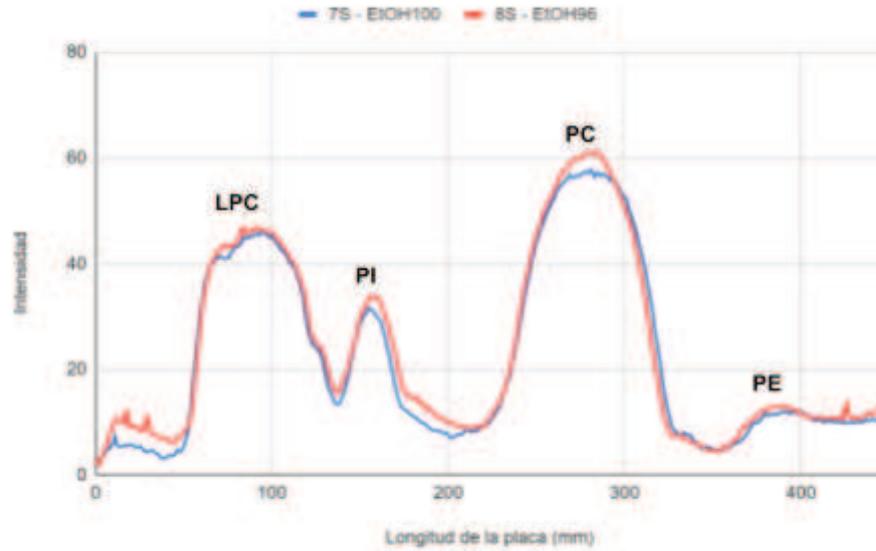


Figura 4.12.B. Gráfica de los picos de las experiencias: EtOH 96%, EtOH 100% (L8S y L7S).

Experiencia	%LPC	%PI	%PC	% PE	% Otros PLs
Materia prima	18%	7%	29%	28%	18%
Etanol 100% (L7S)	32%	10%	49%	6%	3%
Etanol 96% (L8S)	33%	11%	49%	5%	2%

Tabla 4.6 Composición relativa de fosfolípidos por experiencia, de la fase soluble en alcohol: EtOH 100%, EtOH 96% (L7S y L8S)

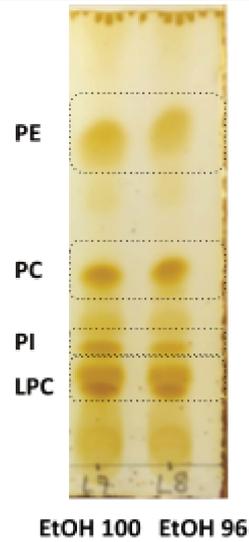


Figura 4.13.A TLC la fase insoluble en alcohol. El orden de las experiencias es el siguiente: EtOH 100, EtOH 96 (L7, L8)

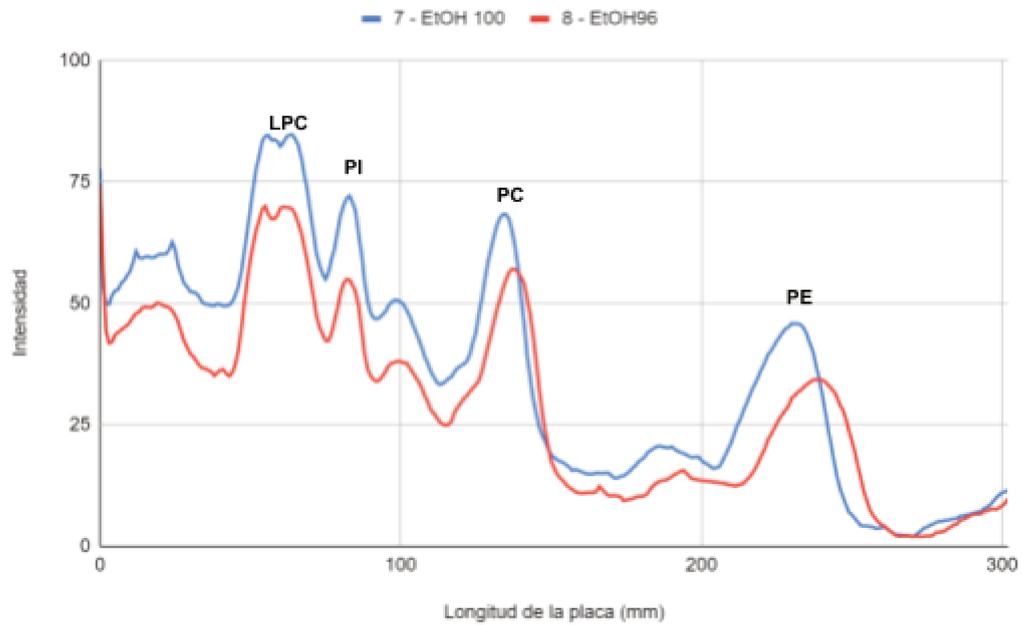


Figura 4.13.B Gráfica de los picos de las experiencias: EtOH 100%, EtOH 96% (L7 y L8).

En la Tabla 4.8 se puede observar que en todas las experiencias, desde la 1 a la 8, en la fase insoluble en alcohol las concentraciones de fosfatidilcolina se mantienen en valores menores a la muestra original (28%).

Experiencia	%LPC	%PI	%PC	% PE	% Otros PLs
Materia prima	18%	7%	29%	28%	18%
Etanol 100% (L7)	23%	11%	14%	25%	27%
Etanol 96% (L8)	25%	10%	21%	25%	19%

Tabla 4.7 Composición relativa de fosfolípidos por experiencia, de la fase insoluble en alcohol: EtOH 100%, EtOH 96% (L7 y L8)

Estos resultados, que indican que aumentar la relación lecitina:alcohol mejora significativamente la concentración de la PC, sugiere estrategias para potenciar este efecto, por ejemplo realizando múltiples etapas de extracción con alta relación lecitina:alcohol (e.g. 1:3), en lugar de una etapa de menor relación (e.g. 1:10).

Experiencia	Fase soluble en alcohol % PC	Fase insoluble en alcohol % PC
1 MeOH	34%	19%
2 EtOH 96	35%	26%
3 IPA	35%	24%
4 MeOH	38%	15%
5 EtOH 96	36%	16%
6 IPA	48%	16%
7 EtOH 100	49%	14%
8 EtOH 96	49%	21%

Tabla 4.8 - Comparación del contenido de PC entre las fases ricas en PC y en PE.

4.4. Balances de masa

A fin de estimar los rendimientos por etapas de extracción en el proceso de purificación, se registraron las masas resultantes luego de cada uno de los pasos involucrados.

Teniendo en cuenta las concentraciones y las masas resultantes de las distintas etapas del proceso de purificación, se graficaron las masas (en gramos) de cada fase, como se muestra en la Figura 4.14. La primera barra de la figura corresponde al análisis de 4 gramos de lecitina inicial. Las otras barras presentan las masas obtenidas de los diferentes fosfolípidos en la fase soluble y en la insoluble en cada alcohol y secuencia de extracción. Estas fases se denominan "fase sol" (correspondiente a la parte soluble en alcohol) y "fase ins" (la parte no soluble en los solventes alcohólicos). En este análisis, se consideraron los fosfolípidos de mayor interés y proporción, como la fosfatidilcolina (PC) y la fosfatidiletanolamina (PE), agrupando el resto bajo el término "Otros PLs".

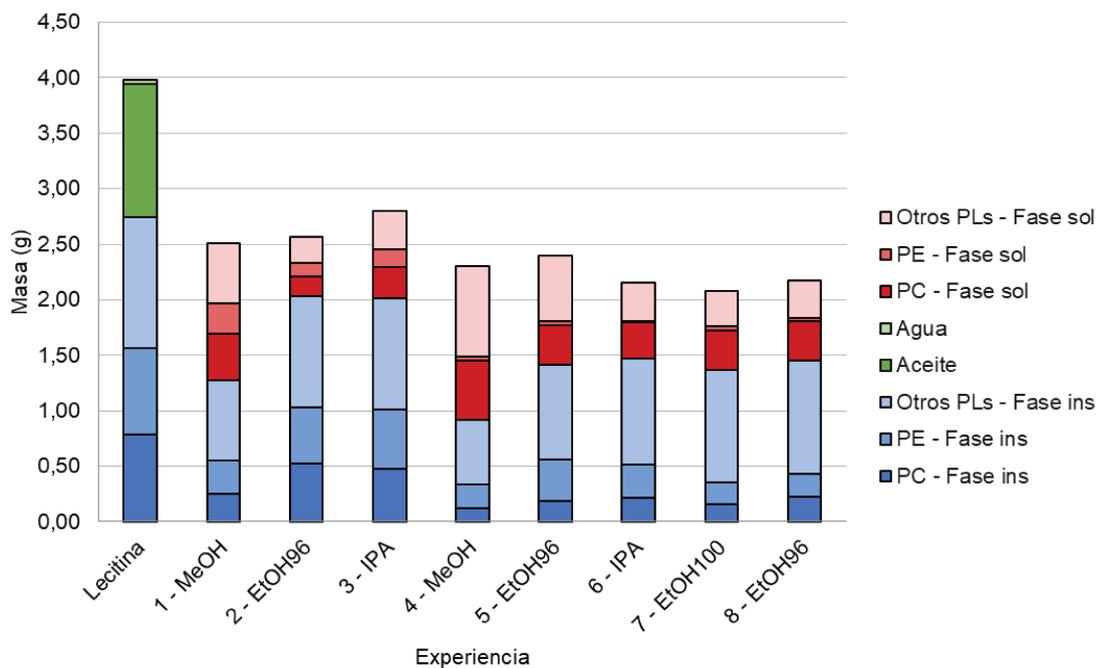


Figura 4.14. Distribución de masas (g) en las distintas fases del proceso de purificación de Lecitina de Soja, para todas las experiencias.

Se observa que, en la mayoría de los casos, a excepción de la Experiencia 4 con metanol, la fase insoluble en alcohol (es decir, la fase que no es rica en fosfatidilcolina, PC) es la de mayor proporción. En la Tabla 4.8 se detallan las proporciones exactas en las que se extrajo cada fase. Cabe destacar que el resto de cada muestra, que no quedó ni en la fase soluble ni en la insoluble, corresponde a la pérdida de agua y aceite a lo

largo de las extracciones, así como a la merma propia del proceso de manipulación de la muestra.

Se puede observar en la Figura 4.14, que las experiencias realizadas con la secuencia acetona-acetona-alcohol, las masas recuperadas de la fracción de muestra que excluye al aceite y al agua (experiencias 1, 2, 3), son mayores que las recuperadas con las secuencias alcohol-acetona-acetona. Las fases insolubles que resultan en este caso, son de apariencia más seca y limpia que en el caso de la secuencia acetona-acetona-alcohol, en la cual los sólidos son de textura más gomosa, como puede observarse en la Foto 4.4. Es decir que en esta secuencia la acetona estaría extrayendo mayor cantidad de impurezas, lo que conduciría a una menor masa final.

Experiencia	% Fase Insoluble	% Fase soluble
1 (MeOH)	32%	31%
2 (EtOH 96)	51%	13%
3 (IPA)	50%	20%
4 (MeOH)	20%	35%
5 (EtOH 96)	29%	25%
6 (IPA)	34%	17%
7 (EtOH 100)	34%	18%
8 (EtOH 96)	36%	18%

Tabla 4.8 - Rendimientos de fases por etapa

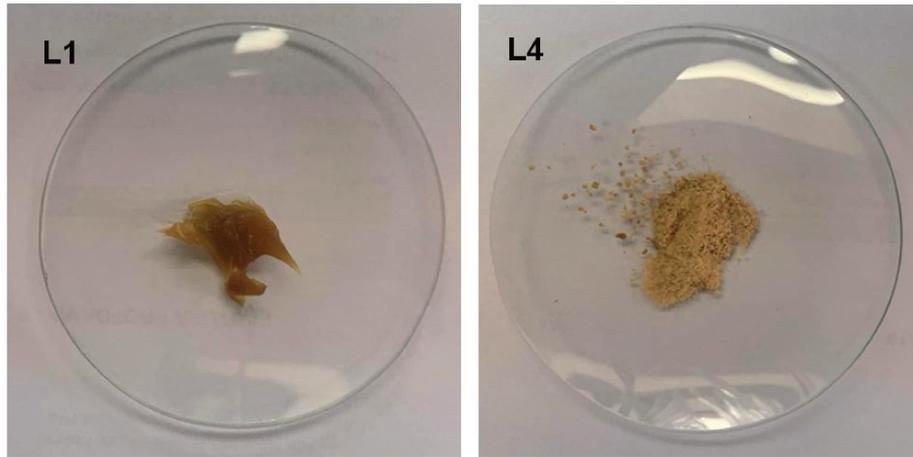


Foto 4.4 Fracciones insolubles en metanol siguiendo diferentes secuencias de extracción.
L1: acetona-acetona-metanol / **L4:** metanol-acetona-acetona

En resumen, partiendo de 4 g de lecitina que contiene 0,79 g de fosfatidilcolina (PC), equivalente al 19,75%, se logra extraer entre 0,18 y 0,53 g de PC en la fase soluble en alcohol (rica en PC), según la experiencia. Esto significa que la recuperación de PC varía entre el 23% y el 67%. Los resultados detallados se presentan en la Tabla 4.9.

Experiencia	PC (g) Fase soluble en alcohol - Rica en PC	% PC respecto de la lecitina de partida
Lecitina	0,79	100%
1 - MeOH	0,42	53%
2 - EtOH96	0,18	23%
3 - IPA	0,27	35%
4 - MeOH	0,53	67%
5 - EtOH96	0,36	45%
6 - IPA	0,33	41%
7 - EtOH100	0,35	45%
8 - EtOH96	0,35	44%

Tabla 4.9 - Cantidad de PC (g) resultante en fase soluble en alcohol

4.5. Conclusiones

En base a los resultados obtenidos se puede decir que las experiencias en las cuales la primera extracción consiste en una solución alcohólica, se logran mejores valores de pureza de PC que en los casos en los que esta extracción se encuentra como tercer paso. Este comportamiento se explica por la propiedad anfifílica de las moléculas de fosfolípidos y, en consecuencia, su propiedad para formar estructuras bicapa y micelares dependiendo del tipo de fosfolípido y del medio en el que se encuentren. En este contexto, al realizar las extracciones con acetona en primera instancia se está retirando la fracción de lípidos neutros de la mezcla de lecitina y los fosfolípidos restantes formarán nuevas estructuras buscando estabilizarse, posiblemente con la parte no polar de otro de los fosfolípidos. Al agregar el alcohol como última etapa de extracción, la fosfatidilcolina no se encontraría tan fácilmente accesible para su extracción como cuando el alcohol se emplea como primera etapa de extracción.

Por otro lado, se observa que a diferentes concentraciones de alcohol (por ejemplo, comparando experiencias de lavados con alcohol etanol al 96% y 100% (L8 y L7) no se observan diferencias en el resultado de purificación. Sin embargo, sí se observan mejoras cuando el etanol 96 se utiliza en proporción lecitina:alcohol = 1:3 m/v con respecto a la muestra, que se utiliza en relación 1:10 m/v.

Este es un resultado muy interesante, dado que indica que al bajar la cantidad de solvente se amplifica la diferencia que se disuelve de la PC respecto de los otros fosfolípidos. Esto abre otra línea de optimización en la cual, según este resultado, será más conveniente realizar múltiples extracciones con baja cantidad de solvente, que una extracción con gran cantidad de solvente.

Además, si observamos el valor de PC de la lecitina de partida luego de las extracciones con acetona (L0), es de aproximadamente 29% (de un 69% de fosfolípidos inicial), lo cual concuerda con los valores publicados en bibliografía para una lecitina de soja. Éste último punto es relevante, ya que ayuda a validar la técnica utilizada.

Finalmente, vale mencionar que los rendimientos de recuperación de fosfatidilcolina estuvieron entre 23 y 67%, logrando como mayor concentración de este fosfolípido 49%.

4.6. Referencias

- [1] W. Zhang y col., Journal of Chromatography B 798 (2003) 323-331.
- [2] Liu, D., & Ma, F. (2011). Soybean phospholipids Recent trends for enhancing the diversity and quality of soybean products: IntechOpen.
- [3] Dario M. Cabezas. Food Industry (2013) 25, 589-602.
- [4] Rahul D. Jangle, Vijayanand P. Magar, Bhaskar N. Thorat Separation and Purification Technology 102 (2013) 187–195.
- [5] Johnson V. John, Huiju Park, Hye Ri Lee, Hongsuk Suh and Il Kim, Eur. J. Lipid Sci. Technol. 2015, 117, 1647–1654
- [6] Norma AOCS JA 7-86

Capítulo 5

EMPLEO DE PC CONCENTRADO EN DESARROLLO DE VACUNAS

5. EMPLEO DE PC CONCENTRADO EN DESARROLLO DE VACUNAS

5.1. Trabajo interdisciplinario realizado

Esta parte de la tesis se desarrolló en el marco de un proyecto interdisciplinario titulado "Fabricación y evaluación de un adyuvante destinado a vacunas a partir de fosfolípidos purificados de los residuos del desgomado de la aceites industriales", financiado por la Agencia Santafesina de Ciencia, Tecnología e Innovación (Investigación Orientada, Código: IO-2018-00062). Este proyecto se sustenta en el conocimiento de los investigadores del Laboratorio de Tecnología Inmunológica (LTI) de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral, quienes previamente desarrollaron una vacuna eficaz contra el parásito *T. Cruzi* (cepa Tulah).

Los adyuvantes son compuestos que se incorporan a las vacunas para aumentar la inmunogenicidad de los antígenos o prolongar su efecto estimulador (Apostólico et al., 2016).

Se han elaborado distintas clases de adyuvantes, entre los que se incluyen los basados en cajas lipídicas (Morein et al., 1984.). El adyuvante ISPA (Immunostimulating Particle Antigen) está compuesto por fosfolípidos, saponina, colesterol, esterilamina y, tocoferol, y su actividad inmunoestimuladora ha sido probada previamente (Bertona et al. 2017.) Sin embargo, debido a que varios componentes del adyuvante ISPA son comerciales, como los fosfolípidos y el colesterol, para la aplicación en vacunas veterinarias, sería una gran ventaja el reemplazo de dichos compuestos por otros de origen natural y de menor costo.

En este marco, el objetivo de este proyecto fue obtener concentrados de fosfatidilcolina (PC) purificados a partir de los residuos del desgomado del aceite de soja, con el fin de utilizarlos en una formulación alternativa del adyuvante ISPA, de menor costo y apto para ser implementado en vacunas veterinarias.

Las mezclas enriquecidas en fosfatidilcolina estudiadas en esta tesis han sido empleadas en la formulación de vacunas. Éstas se han evaluado *in vivo* con muy buenos resultados, generando los anticuerpos correspondientes.

A diferencia de las formulaciones previas de ISPA (ISPA original), las formulaciones alternativas a partir de extractos de lecitina de soja, presentan la particularidad de poseer otros componentes lipídicos (fosfolípidos principalmente) de los cuales se desconoce su comportamiento en el proceso de formación de complejos inmunoestimulantes (ISCOMs). En este caso particular, al estar enriquecido en fosfatidilcolina, pero también conteniendo otros componentes, se pudo observar un comportamiento particular. En la Tabla 5.1, se detalla la fórmula resultante. Resulta notablemente menor la concentración utilizada de colesterol en esta fórmula (denominada ISPAv) respecto de ISPA original dado que el agregado del mismo en concentraciones mayores daba lugar a inestabilidad del preparado y precipitaciones en las mezclas.

Constituyentes	Concentración
EXTRACTO DE LECITINA ENRIQUECIDO EN PC	2,36 mg/mL
COLESTEROL	0,13 mg/mL
<i>Estearilamina Sn. 3%</i>	<i>0,15 mg/mL</i>
<i>a-Tocoferol Sn. 1%</i>	<i>0,029 mg/mL</i>
<i>Saponina QuilA</i>	<i>6,48 mg/mL</i>
<i>Agua calidad MilliQ</i>	<i>0,259 mi/mL</i>
<i>Buffer Acetato de Sodio 50mM - pH 5.5</i>	<i>0,656 mi/mL</i>
<i>Etanol 96°</i>	<i>0,08 mi/mL</i>

Tabla 5.1: Composición de las nanopartículas optimizadas, ISPAsv.

Esto pueda explicarse considerando que este tipo de lípidos, de origen natural, presentan esteroides propios, como así también una alta concentración de ácidos grasos poliinsaturados, lo que podría aportar mayor flexibilidad y estabilidad a las nanopartículas sin necesidad de adicionar altas concentraciones de colesterol sintético o de alta pureza, lo que repercute en una reducción de costos. Finalmente, se evaluó la capacidad protectora contra T. Cruzi del nuevo adyuvante ISPAv generado con las fracciones de fosfolípidos extraídos de lecitina. Para ello, se realizaron inmunizaciones

en ratones y luego, a los 15 días posteriores de la última dosis, los animales fueron desafiados con 1000 tripomastigotes de la cepa Tulahuén de *T. cruzi*.

Los animales inmunizados e infectados mostraron menor parasitemia a los 15 y 20 días post-infección en comparación con los animales no inmunizados. Asimismo, los animales inmunizados presentaron una sobrevida elevada del 80% contra la infección del parásito, mientras que los ratones que no fueron inmunizados presentaron una sobrevida del 0% y sucumbieron en un 100% ante la infección.

Estos resultados son similares e incluso superiores a la capacidad protectora alcanzada con el adyuvante ISPA elaborado con fosfolípidos comerciales y por lo tanto son muy promisorios para el empleo de ISPAv como adyuvante de vacunas, principalmente veterinarias, en donde es necesario reducir el costo de los insumos y el empleo de fosfolípidos extraídos de la lecitina de soja podría ser un insumo que permita disminuir los costos de la producción de un adyuvante competitivo en el mercado.

Capítulo 6

CONCLUSIONES GENERALES

6. CONCLUSIONES GENERALES

6.1. Adopción de la técnica a utilizar

A fin de determinar la sensibilidad del análisis por TLC a la concentración de los componentes de la fase móvil, en esta tesis se evaluó el efecto de esta variable en la resolución de las señales, a fin de detectar lo/s solventes cuya composición tiene mayor influencia en la respuesta analítica. Las principales observaciones se resumen a continuación.

Fase A: Cloroformo, Metanol, Hidróxido de amonio 7N

- Al variar la concentración de cloroformo, no se detecta variación en la tiempos de retardo para la PC y la PE.
- Al variar la concentración de metanol, se observa que a mayor cantidad de metanol, mayor es la separación entre los compuestos prioritarios

Fase B: Cloroformo, Metanol, Ácido acético, Agua destilada

- Al disminuir la concentración de cloroformo, se aumenta el factor de retardo de la fosfatidilcolina y la fosfatidiletanolamina.

Por otro lado, se determinó que el volumen de fase móvil cargado en la cubeta es una variable muy importante para lograr repetitividad en los análisis. Por ejemplo, se demostró que a menor volumen cargado, mayor variabilidad. Esto es debido a que cuando la cantidad del solvente en la cubeta es baja, se evaporan selectivamente los compuestos de la Fase B, cambiando su concentración progresivamente en el tiempo, haciendo así que los componentes de la muestra salgan a tiempos diferentes de lo esperado.

Teniendo en cuenta la importancia de lograr separar la PC del resto de los compuestos presentes en la mezcla, pero principalmente de uno de los compuestos de mayor concentración, como lo es la PE, se mostró que el método de análisis en placas de TLC en una dimensión con Fase B, se logra suficiente resolución con un procedimiento analítico sencillo y rápido. No obstante es importante resaltar, que el método analítico de TLC en dos dimensiones permite tener información adicional y mejorar la precisión analítica.

El trabajo realizado en el marco de la presente tesis permitió no sólo implementar la técnica analítica aceptada por la AOCS, sino que determinar la influencia de diferentes factores que afectan la calidad del método, y sobre los cuales la norma no alerta.

6.2. Experiencias de extracción

Los resultados obtenidos de las experiencias de extracción y concentración de fosfatidilcolina, indican que la mejor alternativa entre las ensayadas es la que utiliza el etanol 96%, con una relación lecitina:alcohol = 1:3 m/v. Además, en la secuencia de extracciones el alcohol debe utilizarse en la primera extracción, y no luego de las extracciones con acetona.

En este caso, se alcanza un 49% de fosfatidilcolina (PC) en la fase rica en PC, que es la soluble en alcohol. Es importante destacar que, aunque con etanol al 100% se obtienen resultados similares, se priorizará el uso de etanol al 96%. Dado que la lecitina y/o gomas normalmente tienen agua, no parece necesario utilizar un alcohol el etanol anhidro. Por otro lado, el precio del etanol 96% es significativamente menor. También se destaca el hecho de que el etanol es de baja toxicidad y se obtiene a través de la fermentación de biomasa, lo que lo convierte en una opción más sostenible. Al emplear este tipo de etanol, no solo se aprovechan los residuos del proceso de desgomado del aceite, sino que también se utiliza un solvente que proviene de la valorización de residuos de biomasa, contribuyendo a un proceso más amigable.

6.3. Balances de masa

Los rendimientos globales promedios obtenidos luego del proceso de separación y purificación ronda el 40%, habiéndose logrado un rendimiento del 67% en el mejor caso, y de aproximadamente del 45% en los casos en los cuales se logró la mayor concentración de PC.

6.4. Empleo de PC concentrado en desarrollo de vacunas

Los hallazgos obtenidos por un laboratorio de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral muestran que el adyuvante ISPAV, elaborado a partir de la purificación de fosfolípidos provenientes del proceso de

desgomado del aceite de soja, es tan efectivo o incluso más efectivo que el adyuvante comercial ISPA elaborado con fosfolípidos comerciales en términos de capacidad protectora. Por lo tanto, se presenta un gran potencial de aplicación en el uso de ISPAV como adyuvante en vacunas, especialmente en el ámbito veterinario, donde reducir los costos de producción es fundamental. El uso de purificados de fosfolípidos del desgomado de la fabricación de aceite de soja como insumo puede ser una opción viable para lograr un adyuvante competitivo en el mercado.

Capítulo 7

ACTIVIDADES FUTURAS

7. ACTIVIDADES FUTURAS

En el marco del presente estudio, se utilizó el análisis por cromatografía en capa delgada en una dimensión, dado que presenta suficiente resolución para la etapa del estudio en la que se ejecutó la presente tesis. Si bien se pudo sacar conclusiones contundentes respecto de la concentración de la fosfatidilcolina, principal objetivo del estudio, se observaron resultados en los cuales los lisofosfolípidos también se concentraban en una de las fases, y dado que las señales de la lisofosfatidilcolina y la lisofosfatidiletanolamina no se resuelven perfectamente en una dimensión, este aspecto no pudo ser evaluado en profundidad.

Por otro lado, las secuencias de extracción que se ensayaron, mostraron importantes diferencias al cambiar el alcohol, la secuencia de solventes usados, y la relación lecitina:alcohol. A fin de mejorar la eficiencia del proceso de extracción se planea trabajar realizando experiencias adicionales, realizando extracciones sucesivas con alta relación lecitina:alcohol, por ejemplo la usada en algunas experiencias en este estudio que fue 1 g/3 mL. Se extenderá este estudio a los otros alcoholes, dadas las diferencias observadas en las extracciones con los diferentes alcoholes.

Los fosfolípidos que se concentran en la fase alcohólica, presentan diferentes grados de polaridad. Por ejemplo, el lisofosfolípido presenta mayor polaridad que la forma no lisada. Por lo tanto se evaluará la cristalización fraccionada como una etapa a aplicar a la fase en la cual ya se concentró la fosfatidilcolina.

El alto costo de este fosfolípido concentrado, posibilita utilizar diferentes estrategias y complementarlas para lograr obtenerlo con el grado de pureza demandado en las aplicaciones farmacéuticas.

ANEXOS

Anexo 1: Fósforo (g fósforo/100 g muestra) - AOCS Ca 12-55

Procedimiento

1. Pesar de 3,3 – 3,2 g de la muestra en un crisol limpio y rotulado.
2. Agregar 0,5 g ZnO.
3. Preparar blanco de reactivo (sin muestra, solo con los 0,5 g de ZnO).
4. Calentar levemente hasta que espese la muestra. Aumentar levemente el calentamiento hasta carbonizar completamente.
5. Llevar a mufla a 550°C durante 2h. Enfriar a temperatura ambiente.
6. Agregar a cada crisol 5 mL de H₂O destilada caliente (a ebullición suave) y 5 mL de HCl concentrado con pipeta, lavando las paredes del crisol.
7. Cubrir inmediatamente con vidrio reloj y calentar hasta ebullición suave (presencia de gotas condensadas en el vidrio reloj).
8. Filtrar en matraces de 50 mL para muestras que se suponen que poseen nulo-bajo contenido de P, 100 o 200 mL para muestras de bajo-moderado contenido de P y 500 mL para alto contenido. Hacerlo con ayuda de un vigilante de vidrio, lavar el vidrio y el crisol con pequeñas porciones de agua destilada caliente.
9. Enfriar a temperatura ambiente y neutralizar hasta aparición de precipitado blanco de ZnO, con una pequeña cantidad de solución de KOH al 50% p/p. agregar HCl concentrado en pequeñas cantidades hasta redisolución del sólido, y agregar 2 gotas más. Enfriar a temperatura ambiente y llevar a volumen con H₂O destilada, tapar mezclar cuidadosamente.
10. Pipetear 10 mL de la solución preparada anteriormente en matraz de 50 mL (bien limpio y seco).
11. Agregar 8 mL de solución de sulfato de hidracina (N₂H₆SO₄) y 2 mL de solución de molibdato de sodio (Na₂MoO₄·2H₂O) en ese orden (si no se realiza así, no se desarrollara color).
12. Tapar e invertir 2 o 3 veces para mezclar bien. Sacar la tapa y calentar 10±0,5 min en baño de agua hirviendo vigorosamente.
13. Sacar del baño, enfriar a temperatura ambiente, llevar a volumen con agua destilada, tapar y mezclar cuidadosamente.

-
14. Transferir a una cubeta limpia y seca. Con la lámpara del espectrofotómetro encendida un tiempo antes para que se caliente bien, medir absorbancia a 825 nm con el equipo ajustado 100% Abs para la cubeta con el blanco de reactivos. En el caso de realizar mediciones de varias muestras, realizarlo por orden creciente de contenido de P (visualmente, del azul más claro al más oscuro).
 15. Con absorbancia medida, calcular el contenido de P en mg con la ecuación de la curva del equipo:

$$\% \text{ Fósforo} = \frac{10(\text{Contenido de P en muestra (mg)} - \text{Contenido de P en el blanco (mg)})}{\text{Masa de la muestra (gr)} \times \text{Volumen de alícuota de 8}}$$

Para la curva de calibrado se realizan distintas disoluciones de una solución de KH₂PO₄ en agua destilada y se opera de igual forma a partir del punto 11.

Preparación de soluciones

- Molibdato de sodio (N₂H₆SO₄): Agregar 140 mL de H₂SO₄ a 300 mL de agua destilada. Enfriar a temperatura ambiente y agregar 12,5 g de Molibdato de sodio sólido. Diluir a 500 mL de agua destilada. Dejar en reposo al menos 24 h antes del uso.
- Sulfato de Hidracina (N₂H₆SO₄) al 0,015 %p/p: Disolver 0,150 g de sulfato de hidracina em 1 l de agua destilada.
- Hidróxido de Potássio (KOH) al 50%: disolver 50 g de KOH en 50 mL de agua destilada.

Anexo 2: Material Insoluble en Acetona - AOCS Ja 4-46

Definición

Este método determina la materia insoluble en acetona bajo las condiciones de la prueba, libre de arena, harina y otro material insoluble en éter de petróleo. Los fosfatídicos se incluyen en la fracción insoluble en acetona.

Alcance

Aplicable a la lecitina de aceites de soja y maíz.

Equipamiento

- Centrífuga: impulsada por motor con cabezal para sostener tubos de centrifuga especificados, capaz de operar a 1900 (+100) rpm.
- Tubos de centrifuga: Pyrex™ de pared gruesa, fondo redondo con borde, capacidad de 40 mL; Corning no. 8240 o equivalente.
- Varillas de agitación: 5 mm de diámetro, longitud conveniente.
- Bureta: capacidad de 50 mL.
- Vasos de precipitados: de 250 y 400 mL.
- Horno de convección forzada: Especificación AOCS H 1-39.

Reactivos

1. Éter de petróleo: Especificación AOCS H 2-41.
2. Acetona: grado ACS, presaturada con material insoluble en acetona purificado de la siguiente manera:

(a) Purificación de fosfatídicos: Purificar los fosfatídicos de determinaciones anteriores de insolubilidad en acetona disolviéndolos en 5 g de 10 mL de éter de petróleo y reprecipitando con 25 mL de acetona. Asegúrese de que el precipitado esté libre de conglomerados antes de continuar. Transfiera el precipitado a dos tubos de centrifuga, utilizando acetona adicional para facilitar la transferencia. Agite bien y complete a un volumen de 40 mL, agite, enfríe durante 15 minutos en un baño de hielo a 0-5 °C, agite nuevamente y centrifugue durante 5 minutos. Decante la solución de acetona, deshaga los sólidos con la varilla de agitación, llene nuevamente los tubos con

acetona, agite, enfríe, centrifugue y decante como antes. Los sólidos después de la segunda centrifugación no requieren más procesamiento y pueden usarse tal cual para presaturar acetona.

(b) Saturación de acetona: Agregue fosfatídicos purificados a la acetona a 5 °C. Cinco gramos de fosfatídicos son suficientes para aproximadamente 16 L de acetona. Mantenga a 5 °C durante 2 horas, agitando vigorosamente en intervalos de 15 minutos. Decante a través de un papel de filtro rápido, evitando la transferencia de sólidos al papel y realizando la filtración bajo condiciones refrigeradas (0-5 °C) para mantener las mismas condiciones de saturación descritas en el procedimiento.

Preparación de la muestra

1. Mezcle bien. Si la muestra de prueba es plástica, puede calentarse para facilitar la mezcla, pero no la caliente a más de 60 °C y evite un calentamiento prolongado.

Procedimiento

1. Pese 1.9-2.0 g (± 0.0005 g) de la muestra de prueba bien mezclada en un tubo de centrífuga que ha sido pesado previamente con una varilla de agitación.
2. Agregue 15 mL de acetona saturada desde una bureta. Caliente en un baño de agua hasta que la lecitina se derrita, pero evite la evaporación de la acetona. Agite hasta que el material esté completamente desintegrado. Coloque en un baño de agua helada y enfríe durante 5 minutos.
3. Retire el tubo del baño y agregue aproximadamente la mitad del volumen final requerido de acetona saturada fría (0-5 °C). Agite bien para completar la dispersión de las partículas restantes. Complete a un volumen de 45 mL con acetona fría (0-5 °C), agite y coloque el tubo y su contenido en un baño de hielo a 0-5 °C durante 15 minutos.
4. Al final del período de enfriamiento de 15 minutos, agite nuevamente mientras está en el baño; retire la varilla y centrifugue inmediatamente a 1900 (+100) rpm durante 5 minutos. Decante el material soluble en acetona en un vaso de precipitados limpio.

5. Rompa los sólidos centrifugados con la varilla de agitación asignada y rellene el tubo de centrifuga hasta la marca de 40 mL con acetona fría (0-5 °C); agite bien y repita como se indica en el Procedimiento 3 y 4.
6. Durante la segunda centrifugación y el vertido del solvente, devuelva la varilla de agitación al tubo y deshaga los sólidos. Coloque el tubo y el contenido en posición horizontal sobre una mesa de laboratorio hasta que el exceso de acetona se evapore. Mezcle nuevamente y coloque en un horno de convección forzada a 105 (+2) °C hasta obtener un peso constante, generalmente de 30 a 45 minutos. Enfríe a temperatura ambiente en un deshidratador eficiente y pese inmediatamente.

Cálculos

$$\text{Material Insoluble en acetona \%} = \left[\frac{\text{masa, g de residuo}}{\text{masa, g de muestra}} \times 100 \right] - \% \text{ Insoluble en Hexano } *$$

(*como se determina por el Método Oficial AOCS Ja 3-87)

Reproducibilidad

La variación promedio de los componentes calculados a partir de los datos colaborativos, siguiendo límites de probabilidad del 95%:

1. La diferencia entre determinaciones duplicadas realizadas dentro de un laboratorio no debe exceder el 10%.
2. La diferencia entre el promedio de las determinaciones duplicadas realizadas en diferentes laboratorios no debe exceder el 17%.

Anexo 3: Contenido de humedad(g agua/100 g muestra) -

AOCS Ja 2-46

Procedimiento

1. Colocar la muestra homogeneizada, alrededor de 8 g, en un balón de 500 mL.
2. Agregar 500 mL de tolueno y piedritas de cuarzo.
3. Homogeneizar la mezcla agitando.
4. Colocar la trampa de agua Dean-Stark y el refrigerante.
5. Calentar y mantener en ebullición hasta que el nivel de agua en la trampa no varié.
6. Sacar el refrigerante y con un alambre despegar las gotas de la pared de la trampa, si fuese necesario, y registrar el volumen.

Cálculo

$$\text{Humedad \%} = \left[\frac{\text{Volumen (mL de agua)} \times 99.7}{\text{masa, g de muestra}} \right]$$

Con:

Volumen = mL de agua registrados en la trampa.

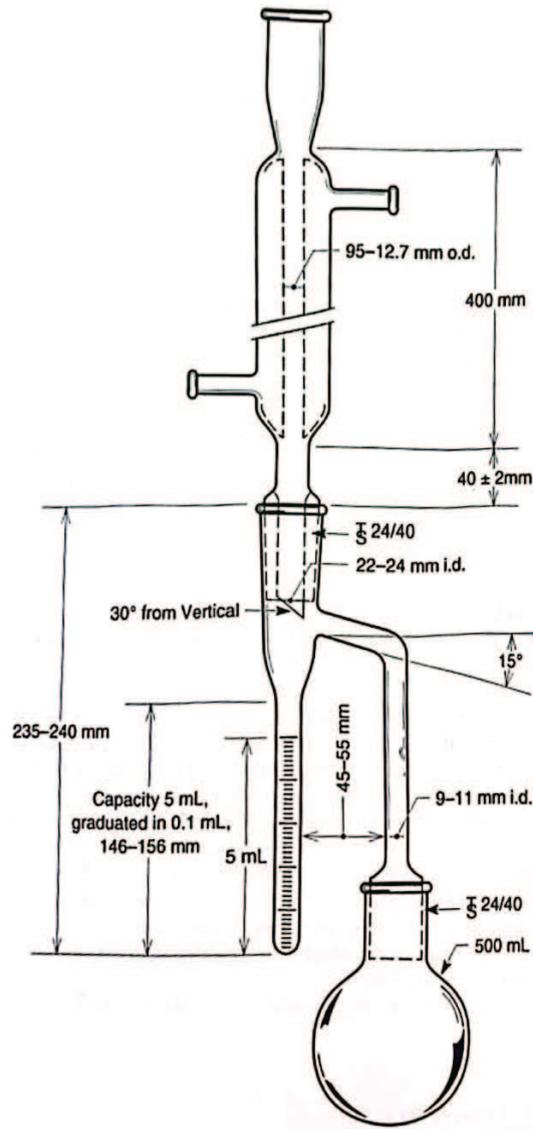


Figura A3.1 - Equipamiento para destilación de humedad.

Anexo 4: Fundamentos de la cromatografía de capa delgada

Se puede definir la cromatografía como un proceso de separación que se lleva a cabo por la distribución de sustancias entre dos fases: la fase móvil (FM) y la estacionaria (FE).

La fase estacionaria y la fase móvil son los dos componentes esenciales de la cromatografía, y las diferentes formas de cromatografía se definen por la naturaleza física de estas dos fases. Así, en la cromatografía gaseosa la fase móvil es un gas y en la líquida un líquido. A su vez, la FE puede ser un líquido o un sólido. Cuando la FM está en forma líquida y la FE sólida, más precisamente en forma de hoja, se la denomina “cromatografía de capa delgada”, conocida como TLC (Thin Layer Chromatography). Es un procedimiento rápido y sencillo para separar mezclas de sustancias, identificar/caracterizar o para determinar semicuantitativamente componentes individuales.

En la cromatografía de TLC, la FE consta de una placa la cual tiene depositada una fase sólida, y la FM consiste en un solvente (o mezcla de ellos). Durante el desarrollo de la TLC, las moléculas se mueven continuamente de un lado a otro entre los estados libre y adsorbido, por medio de un equilibrio dinámico y rápido con las dos fases (FE y FM). Un equilibrio de fuerzas intermoleculares determina la posición de equilibrio y, por lo tanto, la capacidad del solvente para mover el soluto hacia arriba de la placa. Este depende de la polaridad del material de revestimiento de la placa de TLC, de la polaridad del disolvente de desarrollo y de la polaridad de las moléculas de la muestra.

Por ejemplo, con una muestra que consta de dos compuestos A y B como se ilustra en la Figura A4.1, si las moléculas A pasan más tiempo en la fase móvil, serán transportadas a través de la fase estacionaria más rápidamente y avanzarán más distancia en un determinado tiempo. Mientras que si las moléculas B se adsorben en la fase estacionaria más que A, pasan menos tiempo en la fase móvil y, por lo tanto, se mueven a través de la fase estacionaria más lentamente. Consecuentemente, A se separa gradualmente de B a medida que asciende la fase móvil [1].

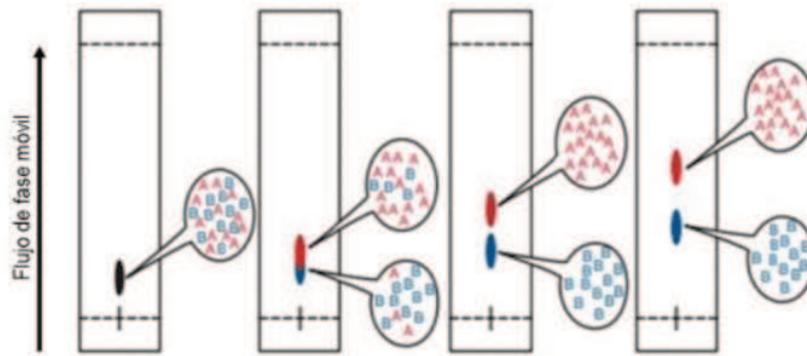


Figura A4.1 – Representación del proceso de separación en TLC

Particularmente, cuando la FE está compuesta por placa con gel de sílice depositado en ella, la cual es una sustancia muy polar, se retendrá en mayor medida componentes más polares. Por otro lado, la FM (eluyente) debe de ser menos polar que la FE de forma que los componentes que se desplacen con mayor velocidad sean los menos polares. Por lo tanto, al revelar la placa cromatográfica, el componente más polar se encontrará más cercano al punto de siembra, y, por el contrario, el componente menos polar se moverá más rápidamente y se encontrará más alejado del punto de siembra.

El estado de equilibrio dinámico puede caracterizarse por un coeficiente de equilibrio o factor de capacidad (k'), definido como la relación de la cantidad o concentración de un componente dado en la fase estacionaria (C_s) con respecto a la fase móvil (C_m):

$$k' = C_s / C_m$$

Quizás se pueda ver que este parámetro tiene una relevancia más inmediata cuando se define en términos de los tiempos de retención (o volúmenes) de un soluto:

$$k' = (t - t_0) / t_0$$

donde t = tiempo de retención de un soluto, y t_0 = el tiempo requerido para que el solvente (o un soluto no retenido) se mueva de un extremo de la columna al otro.

Durante el movimiento del analito, una vez finalizada la corrida, los componentes generan manchas que representaría cada compuesto. Es posible

determinar la movilidad relativa de cada componente con respecto al máximo posible, mediante la medición del “factor de retardo” (Rf). Este factor es el cociente de la distancia (a) recorrida por el analito y la máxima distancia posible recorrida (D), y será único para cada analito (Figura A4.2).

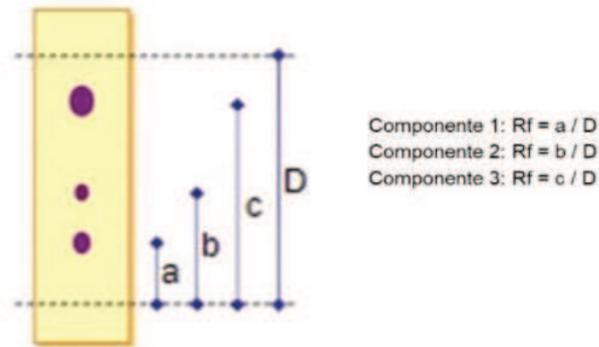


Figura A4.2 – Representación del factor de retardo en placa de TLC

Este factor depende tanto de las condiciones experimentales (temperatura, grado de saturación de la cámara de desarrollo, cantidad de muestra, etc.) como de la composición de la FM y de la FE. Sin embargo, al ser una constante física de cada especie química, el valor de Rf de un compuesto determinado es constante en iguales condiciones analíticas, lo cual permite la identificación de especies.