

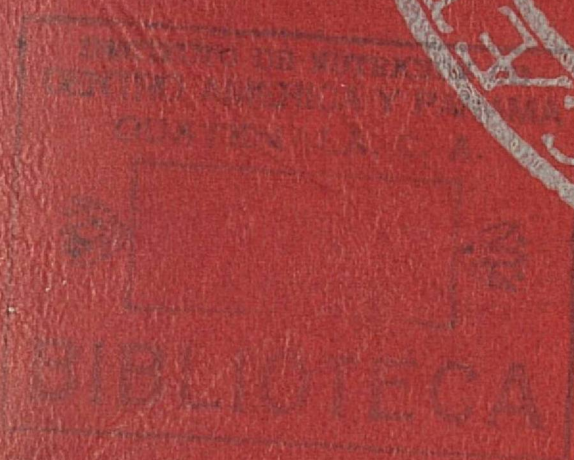
T-260
C.2

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA



DETERMINACION DE ESTEROLES
EN MATERIAS GRASAS



JOSE ROBERTO BENAVIDES SOZA

GUATEMALA, JULIO DE 1978

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

"DETERMINACION DE ESTEROLES EN MATERIAS GRASAS"



GUATEMALA, JULIO DE 1978.

JUNTA DIRECTIVA
DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

Decano:	Lic. Leonel Carrillo R.
Secretario:	Lic. Eduardo Robles
Vocal 1ro.:	Dr. José Hector Aguilar
Vocal 2o. :	Lic. Adolfo León Gross
Vocal 3o. :	Lic. Justo Comas Fuxet
Vocal 4o. :	Br. Juan Carlos Godoy
Vocal 5o. ;	Br. Sergio Rodriguez

ASESOR

Lic. Elsa C. de Reyes

DEDICATORIA

A DIOS TODOPODEROSO

A MIS PADRES:

Alfredo Benavides

Raquel de Benavides

A MI FAMILIA

A LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

A LA FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA.

AGRADECIMIENTO

Se agradece la valiosa cooperación prestada para la realización de este trabajo a las siguientes Instituciones y personas:

Laboratorio Unificado de Control de Alimentos (LUCA)

Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP)

Licenciado Carlos L. Ovalle

Licenciada Elsa C. de Reyes

EN ESPECIAL AL:

Doctor Jorge Zuñiga a quien se debe la realización del presente trabajo.

Mi agradecimiento es extensivo al personal Técnico de LUCA por su amistad y valiosa colaboración.

INDICE

INTRODUCCION

ANTECEDENTES

OBJETIVOS

JUSTIFICACIONES

ASPECTOS METODOLOGICOS

PROGRAMA

ASPECTOS ECONOMICOS

RESULTADOS

GRAFICAS CUADROS Y TABLAS

DISCUSION

CONCLUSIONES

RECOMENDACIONES

BIBLIOGRAFIA

INTRODUCCION

Los análisis para detectar adulteraciones en grasas y aceites, son de rutina en los laboratorios de control de alimentos. Fraudes comunes en el comercio de grasas y aceites son por ejemplo : adiciones de aceites vegetal a las cremas de leche; sebos de origen animal a mantequillas y margarinas; y mezclas de diferentes tipos de aceites, por ejemplo: aceite de algodón y soya, con el objeto de vender el producto como el componente más caro de la mezcla.

Sin embargo, no todas las mezclas de grasas y aceites son consideradas ilegales.

Las normas del Codex Alimentarius, emitidas conjuntamente por F.A.O. y O.M.S. (10), prevee y permite mezclas de grasas y aceites comestibles; entendiendose por grasas y aceites comestibles, los alimentos compuestos de glicéridos de origen vegetal, animal o marino.

La legislación actual de Guatemala, es un tanto restrictiva a este respecto, puesto que existen disposiciones del gobierno que específicamente prohíben la mezcla de sebos animales (bovino y porcino) con aceites vegetales.

La principal ley, publicada en el "Diario de Centroamérica" (Diario Oficial de Guatemala), el 28 de junio de 1974 y amparada bajo Decreto No. 64-74 del Congreso de la República de Guatemala, dice así:

"Artículo 7o. (bis).- Se autoriza a las plantas procesadoras de carne bovina y porcina, autorizadas por el Ministerio de Economía a procesar sebo comestible, proveniente de las partes sanas de los animales sacrificados en Guatemala, bajo estricta inspección sanitaria del Ministerio de Salud Pública y asistencia Social, llenando los requisitos y calidades determinadas por las Normas Sanitarias de Alimentos de la Oficina Sanitaria Panamericana. Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud."--- El Sebo comestible de origen bovino y porcino que se origina de animales sacrificados en el país y que sean declarados aptos para consumo humano por las autoridades sanitarias respectivas, podrá venderse al público, siempre que estén en forma absolutamente pura y no mezclados con ningún otro tipo de grasas Y ACEITES vegetales. Rótulos y etiquetas deberán identificar claramente la naturaleza del producto."

Por lo que antecede, se deriva la necesidad de detectar las mezclas de sebos animales con aceites vegetales, debido a que de acuerdo a la legislación actual del país, son en todos los casos ilegales.

ANTECEDENTES

Los métodos oficiales para detectar mezclas de aceites vegetales con grasas de origen animal, están basados en el análisis de la composición de esteroides presentes en la fracción insaponificable de la muestra de grasa.

El colesterol está presente en las grasas de origen animal (aproximadamente 90mg. de colesterol por 100grms. de grasa). Los fitosteroides en cambio se encuentran en los aceites vegetales.

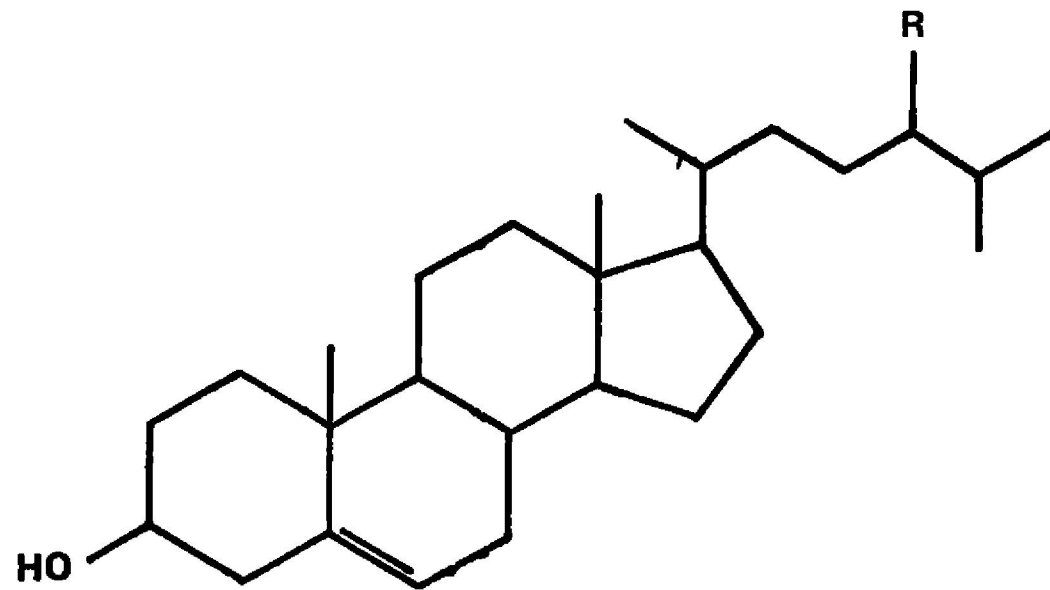
Los componentes más importantes de la mezcla de fitosteroides son: β -sitosterol, estigmasterol y campesterol. Ocasionalmente aparecen el brassicasterol, el Δ^5 y Δ^7 avenasterol y Δ^7 campestenol (ver Fig. I) (1).

En trabajos recientes (6) (9) aparecidos en la literatura se reporta la presencia de colesterol en cantidades pequeñas en algunos aceites vegetales. De todas maneras esta pequeña cantidad no invalida el método para detectar mezclas de grasas de origen vegetal y animal.

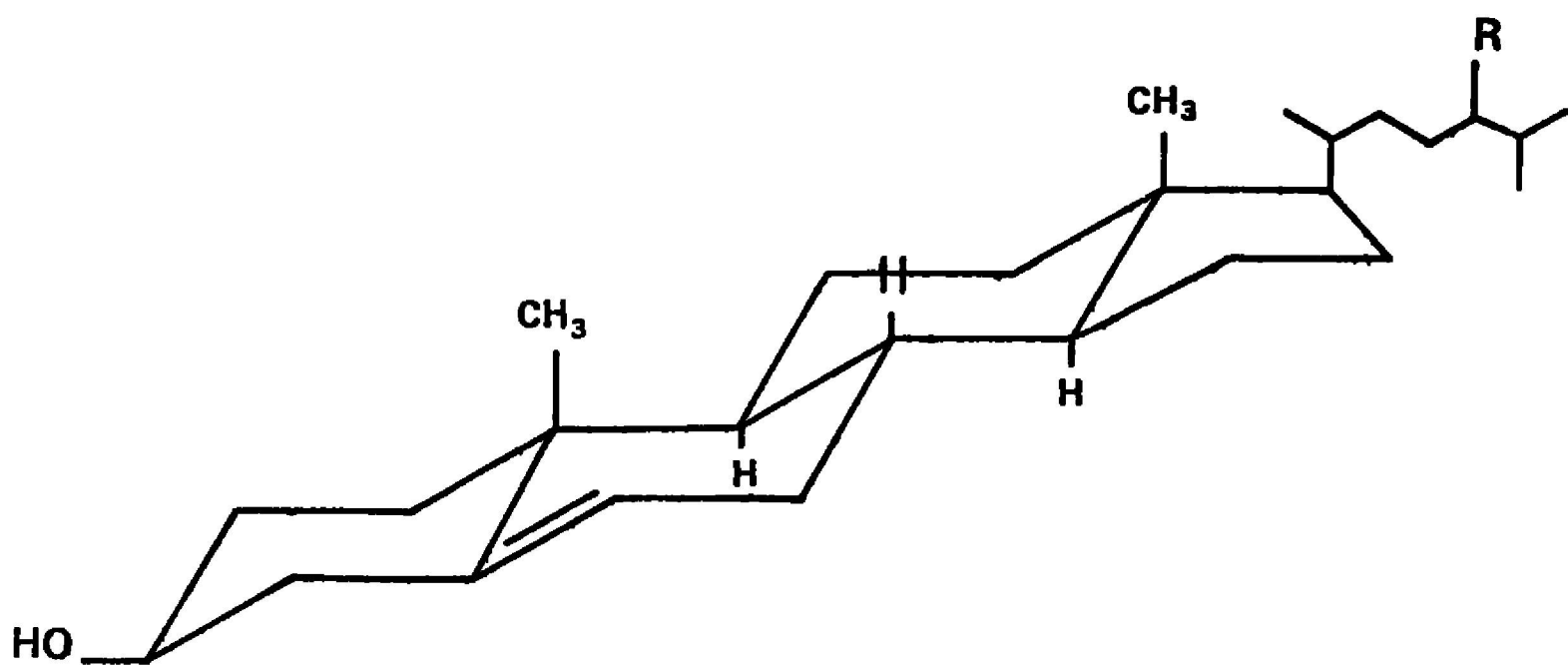
En la tabla I se muestran los principales resultados obtenidos de la literatura (ver Tabla I) (2)

FIGURA I

4



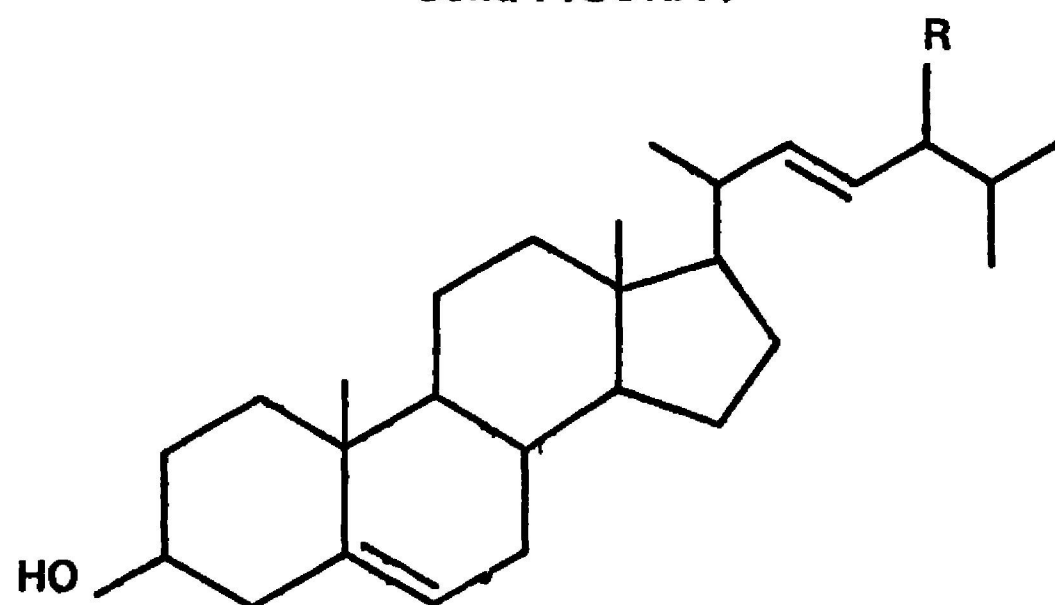
1. R = -H Colesterol
2. R = -CH₃ 24-metilcolesterol (Campesterol)
3. R = -C₂H₅ 24-etilcolesterol (β-Sitosterol)
4. R = -CH-CH₃ 24-etilideno Δ⁵ - colesteno - 3β - ol (Δ⁵ Avenasterol)



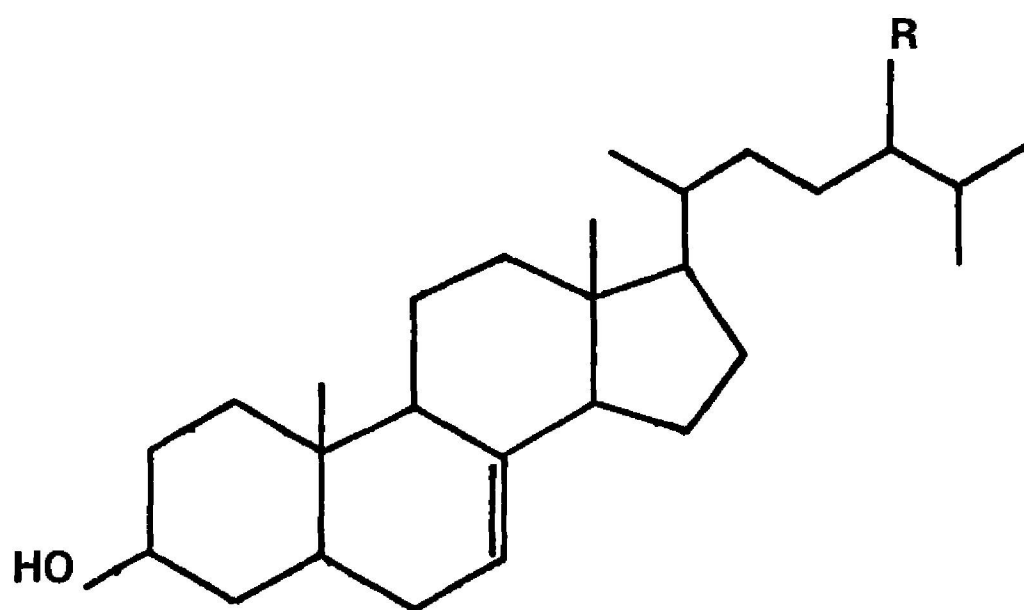
Orientación espacial de la molécula.

Cont. FIGURA I

5



1. $R = -CH_3$ 24 Metil - $\Delta^{5,22}$ -Colestadien- 3β -ol (Brassicasterol)
2. $R = -C_2H_5$ 24-Etil - $\Delta^{5,22}$ -Colestadien- 3β -ol (Estigmasterol)



1. $R = CH-CH_3$ 24-Etilideno- Δ^7 -colesteno- 3β -ol
(Δ^7 Avenasterol)
2. $R = -C_2H_5$ 24-Etil- Δ^7 -colesteno- 3β -ol
(Δ^7 Campestenol)

TABLA I

LÍMITE DE VARIACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE ESTEROLES DE LOS PRINCIPALES ACEITES:

	% de Esteroles Totales en el Aceite	Coles- terol	Brassi- casterol	Campeste- rol o Cam- pest. + Δ^7 Campeste- nol	Δ^7 Cam- pestenol	EStigma- sterol	B - sitost. o B - sitost. + Δ^5 Ave- nasterol	Δ^5 Avena- sterol	Δ^7 Stig- ma o Δ^7 stigmat+ Δ^7 Avena- sterol	Δ^7 Avena- sterol
Maní	0.10 - 0.25	0 - 1.0	0 - tr.*	11.0 - 18.7	-	6.0 - 11.1	72.0 - 77.0	3.6 - 11.5	0 - 3.2	tr - 2.0
Girasol	0.30 0.40	0 - 0.3	-	8.0 - 12.3	0 - 2.6	8.0 - 12.3	61.0 - 75.3	2.5 - 9.2	7.1 - 20.	2.2 - 4.0
Soya	0.26 0.37	0 - 2.0	0 - tr	18.1 - 23.0	-	11.3 - 22.	55.9 - 67.8	1.0 - 3.0	0. - 4.5	1.0 - 1.2
Colza	0.53 0.79	0 - 0.2	4.2 - 9.5	29.7 - 40.0	-	tr - 0.4	52.9 - 59.9	1.2 - 2.0	0 - 0.6	-
Algodón	0.35 0.45	0 - 0.8	0 - tr	4.0 - 9.2	-	0 - 2.5	88.2 - 95.0	2.0 - 2.0	0 - 0.6	-
Palma	0.04 0.06	1.0 - 8.0	-	14.0-24.6	-	8.0 - 13.3	53.0 76.0	0.3 - 2.2	0 - 1.0	-
Coco	0.08 0.23	0 - 2.8	0 - tr	6.0 - 9.0	-	13.0 - 19.8	64.1 - 76.0	4.7 - 25.2	0 - 6.0	0.7 - 2.0
Sardina	0.50 0.76	93 - 98	-	-	-	-	-	-	-	-
Arenque	0.27 0.60	98	-	-	-	-	-	-	-	-

(*) F. Mordret, A. Prevot, J.P. Wolff. Ann Fals. Exps. Chim.,
Feb. 1977, - 20 No. 750 pág. 87- 100.

La forma más conveniente de analizar la fracción esterólica de la fracción insaponificable es por Cromatografía de gas.

El primer trabajo publicado sobre el fraccionamiento de los esteroides presentes en las materias grasas con el fin de efectuar su identificación y determinación cuantitativa, por medio de la Cromatografía en fase gaseosa, se debe a Beerthuis y Recourt (2), quienes demostraron la posibilidad de efectuar separaciones cuantitativas y perfectas con mezclas complejas, utilizando sustancias no polares como fase líquida. Al mismo tiempo se mostró que las elevadas temperaturas a que era necesario efectuar el análisis no daban lugar a descomposiciones o alteraciones estructurales que pudieran desvirtuar las respuestas del detector y la interpretación de los registros obtenidos.

Actualmente la Cromatografía de Gas (C.G.) es la metodología preferida en los análisis de esteroides. Este método se encuentra estandarizado en los manuales oficiales de química analítica. (1) (8)

Ettinger y colaboradores (4) reportan un método para detección de grasas animales en aceites vegetales, basado en la cromatografía gaseosa del total de la materia insaponificable. La presencia de cantidades tan pequeñas como 2.5 % de grasa animal fué detectado, por comparación con estandares conteniendo varios niveles de sebo en aceite vegetal.

Por otra parte (5), es posible, mediante pequeños ajustes en la sensibilidad cromatográfica detectar fácilmente cantidades tan pequeñas como 0.1 mg. de colesterol por 100 gms. de aceite. Esto es equivalente al 0.1% de grasa animal añadida.

Anteriormente se tenía la idea de que en aceites de origen vegetal, el colesterol estaba ausente, pero en trabajos recientes Recourt y Beerthuis (11), encuentran que en el análisis por cromatografía de gases de la materia insaponificable de aceites vegetales, algunas veces se obtiene un pico en la posición del colesterol.

Otras investigaciones (3), han corroborado esta observación. Un componente con el tiempo de retención del colesterol, está presente en pequeñas cantidades

en todos los aceites vegetales comunes incluyendo los aceites de coco, algodón, maíz, palma, almendra, maní, girasol y aceite de soya.

La tabla II contiene los niveles de esteroides más importantes que se encuentran presentes en varios aceites vegetales. (5).

TABLA II**COMPOSICION DE ALGUNOS ACEITES VEGETALES COMESTIBLES POR CROMATOGRAFIA GASEOSA**

ACEITE'	% DE ESTEROLES			R ^b
	CAMPESTEROL	ESTIGMASTEROL	B-SITOSTEROL	
MAIZ	10	1	89	8
MANTECA DE CACAO	8	26	66	2
ALGODON	4	0	96	24
OLIVA	2	0	98	49
MANI	13	3	84	5
SALVADO DE ARROZ	20	8	72	4
CARTAMO	13	6	81	4
SOYA	15	13	72	3

R^b Indica la relación que existe entre el área del pico de B-sitosterol y las áreas de los picos de campesterol + stigmasterol.

(5) Firestone, D. "A review of methods for determining pesticides residues, contaminants and adulterants in fats and oils". J. Am. Oil Chem. Soc., 45:210A-214A, 245A-247A. 1968.

OBJETIVOS

Las adulteraciones más comunes en las sustancias grasas encontradas en Guatemala, son:

- 1) Adición de aceite de algodón a las cremas de leche.
- 2) Adición de mantecas hidrogenadas de aceite de algodón, a la mantequilla.
- 3) Adición de aceites vegetales a sebos animales; lo cual es prohibido por la ley vigente en el país.

Normalmente la detección de estos fraudes se hace de manera cualitativa. Es decir, que la presencia de colesterol en un aceite vegetal, implica que éste ha sido adulterado con grasa de origen animal. Asimismo, si en una grasa animal se encuentran fitosteroles, es un indicio inequívoco de su adulteración con aceites vegetales.

Sin embargo, una detección cualitativa, no da idea de la magnitud del fraude, es decir, la proporción en que el adulterante se encuentra en la muestra.

Es pues conveniente establecer la metodología que permita cuantificar los componentes de la mezcla.

Además es necesario verificar si el colesterol reportado en algunos aceites vegetales, se encuentra presente en el aceite de algodón y sus derivados hidrogenados.

Los objetivos del presente trabajo, son pues, la cuantificación del análisis de esteroides y la verificación de la presencia de colesterol en el aceite de algodón y sus derivados hidrogenados.

JUSTIFICACIONES

La investigación de mezclas de sebos animales, con aceites vegetales, presenta una gran demanda, tanto de parte de la industria privada como de los inspectores de sanidad. Esto implica la necesidad de establecer técnicas adecuadas y probadas para detectar estas mezclas.

La cuantificación de los fraudes efectuados en grasas animales y vegetales, es importante desde el punto de vista legal, en el procesamiento judicial de infractores.

Desde el punto de vista técnico es importante establecer los límites tolerables de colesterol en el aceite de algodón.

ASPECTOS METODOLOGICOS

El trabajo analítico comprende las siguientes etapas:

1. Extracción de la materia insaponificable de la muestra de grasa (*)

Se pesa con exactitud de 2.0 a 2.5 grms. de muestra en un balón de fondo redondo de 50 ml. Se adiciona 25 ml. de etanol al 95% y 1.5 ml. de KOH (3+2). La muestra se saponifica por ebullición bajo reflujo, durante 30 minutos. Ninguna pérdida de alcohol debe ocurrir durante la saponificación.

La solución alcohólica de jabón se transfiere, en caliente, a una ampolla de separación de 250 ml. usando un total de 50 ml. de agua caliente. Se lava el recipiente de saponificación con 50 ml. de éter, el cual se añade a la ampolla de separación. Se agita vigorosamente y se deja que las dos fases se separen.

La fase acuosa se saca de la ampolla de separación y la fase eterea se transfiere, por la boca, dentro de una segunda ampolla de separación, que contiene 20 ml. de H₂O.

(*) Para obtener el residuo insaponificable se utilizó el método recomendado por el "Metodos Oficiales de Análisis de la Asociación de Química Analítica Oficial" (A.O.A.C.) con algunas modificaciones (1).

La primera ampolla de separación se lava con 15 ml. de éter agitando vigorosamente. El lavado se adiciona a la segunda ampolla de separación.

La fase acuosa se devuelve a la ampolla de separación vacía y se extrae tres veces con porciones de 50ml. de éter en la misma forma. Se recomienda hacer un total de 4 extracciones para aceites marinos u otros aceites de alto contenido insaponificable.

Los extractos etereos se combinan en la segunda ampolla de separación con los 20ml. de H₂O y se agita suavemente, con movimientos de rotación. La agitación violenta en este estado, puede causar alguna emulsión problemática. Se elimina la fase acuosa.

La fase eterea se lava con dos porciones adicionales de 20 ml. de H₂O, agitando vigorosamente.

En seguida la fase eterea se lava, alternativamente - tres veces, con porciones de 20ml. de sol. acuosa de KOH 0.5N. y 20 ml. de H₂O, agitando vigorosamente cada vez. Si se forma una emulsión durante el lavado, se extrae la fase acuosa hasta donde sea posible, dejando la emulsión en la ampolla de separación con la fase eterea y se prosigue con el siguiente lavado.

Después del 3er. tratamiento con KOH, se lava la fase eterea, con porciones de 20ml. de H₂O, hasta que el agua de lavado no sea alcalina a la fenoftaleina.

La fase eterea se transfiere a un vaso conico de 250ml., la ampolla de separación se lava con unos pocos ml. de éter. y la sol. de lavado se añade al vaso. Se evapora lentamente hasta aproximadamente 5 ml. y se transfiere cuantitativamente usando algunas pequeñas fracciones de éter, a un vaso cilíndrico de 50 ml. previamente seco y tarado. Se evapora el éter. Cuando el éter ha sido evaporado se añaden 2-3 ml. de acetona y se calienta en una estufa ó en un baño de maría; se completa la evaporación del solvente en una corriente de aire. Se seca a 100°C en períodos de 30 min., hasta peso constante.

2. Aislamiento de los esteroides por cromatografía en capa fina

Los esteroides fueron aislados mediante la cromatografía de capa fina. Se prepararon placas de 20x20cms. y 0.5mm. de espesor, con un equipo "Desaga Brinkmann". Se empleó sílica gel 60 PF 254+366 y sílica gel G para cromatografía preparativa en capa fina.

Como eluyente se utilizó una mezcla de éter de petróleo - éter etílico en proporción de 1:1. La banda de los esteroides se visualizó con luz UV. en el caso de la sílica gel PF 254+366 en el caso de la sílica gel G, se visualizaron las bandas en

una franja de la placa con vapor de I₂.

Como verificación de que la banda extraída era efectivamente la correspondiente a los esteroides, se efectuó un ensayo de Lieberman-Burchard^(*). La banda de esteroides se raspó de la placa y la extracción se efectuó con cloroformo, de la siguiente manera:

Se raspa la banda de los esteroides sobre papel de aluminio y se transfiere la sílica gel a un vaso cónico de 25ml. con tapón de vidrio esmerilado. Se transfiere la sílica gel a un filtro de celulosa de poro grueso, con cinco porciones de 10 ml. de CHCl₃. El filtrado se recoge en un vaso cilíndrico de 50ml. previamente seco y tarado. Se evapora el solvente a sequedad en un baño de maría, bajo corriente de N.

Se lava el vaso con tres porciones de 2ml. de CHCl₃, - teniendo especial cuidado, para disolver cualquier material en las paredes, se transfieren las sol. de lavado a un vial (cilíndrico y muy pequeño y con tapón de rosca), y se evapora a sequedad bajo corriente de N. Se almacenan las muestras en el congelador.

(*) Ensayo de Liebermann-Burchard. Una pequeña cantidad del raspado de la banda de esteroides se transfiere a un tubo de ensayo pequeño. Se adicionan al mismo uno o dos ml. de reactivo de Liebermann (cloroformo-anhídrido acético 2:1). Se a

ñade a la mezcla unas gotas de H_2SO_4 conc. Una coloración azul o rosada indica la presencia de esteroides.

3. Determinación de los esteroides por cromatografía de gas

Para los efectos del análisis de cromatografía de gas, las muestras secas se disuelven en 0.5ml de CH_2Cl_2 y se inyectan mediante una jeringa de 10 μ l.

Los perfiles cromatográficos se obtuvieron con un instrumento de cromatografía de gas "Tracor 222" provisto de un detector de ionización de llama.

Como registrador se empleó un integrador Hewlett Packard 3380 A.

Se utilizó una columna de vidrio de 1/4" de diámetro interno y 6' pies de largo, empacada con 3% de O.V. 1 en cromosorb. La temperatura de la columna, del detector y de inyección fue 270° C., 280° C., 280° C., respectivamente. Se empleó Nitrogeno como gas portador y fue regulado de tal manera que el pico correspondiente al colesterol, se mantuviera constante, a un tiempo de retención de aproximadamente 8.min.

Preparación de las muestras: Las muestras fueron preparadas a partir de aceite de algodón hidrogenado y blanqueado 100% puro marca "NUMAR" y sebo animal, homogenizado y filtrado, proveniente de diferentes regiones anatómicas de ganado bovino.

Un total de 13 muestras fueron preparadas pesando los componentes en una balanza analítica. Las proporciones de las mezclas se indican en la tabla III.

Las muestras fueron homogenizadas agitando continuamente por dos horas a una temperatura de 80° C.

TABLA III

Proporción de aceite hidrogenado de algodón y sebo en las muestras analizadas.

No. de la muestra	% de aceite hidrogenado de algodón.	% de sebo
1	0	100
2	5	95
3	10	90
4	20	80
5	30	70
6	40	60
7	50	50
8	60	40
9	70	30
10	80	20
11	90	10
12	95	5
13	100	0

PROGRAMA

- 1.- Revisión de literatura**
- 2.- Elaboración de las muestras**
- 3.- Trabajo de laboratorio**
- 4.- Tabulación y conclusiones**
- 5.- Análisis estadístico.**

ASPECTOS ECONOMICOS

El financiamiento y costos del trabajo formaron parte del programa de adiestramiento tutorial según reglamentos del INCAP, aplicable también al LUCA, así como del programa de investigación de esas entidades.

RESULTADOS

Los perfiles cromatográficos de las 13 muestras mencionadas en la Tabla III se presentan en el apéndice I, - junto a los cromatogramas de los patrones de Colesterol, β -sitosterol, Campesterol y estigmasterol (ver apéndice I). La identidad de los picos en los perfiles cromatográficos - fué establecida mediante la comparación de los tiempos de - retención con los patrones de los esteroides. Las condiciones del ensayo fueron las mencionadas en la sección de: "Aspectos Metodológicos".

En el cuadro I se resumen los resultados obtenidos para las 13 muestras (cada cifra es el promedio calculado de 2 - perfiles cromatográficos), representativas de los diversos porcentajes de aceite de algodón y sebo. Las áreas de los picos de los perfiles cromatográficos fueron calculadas utilizando un integrador Hewlett Packard modelo 3380 A.

En las muestras No. 12 y 13 aparece un pico no identificado. El origen de ésta señal probablemente es debido a alguna impureza. Siendo el porcentaje muy pequeño; menos del 0.4% de la mezcla total de esteroides, no se tomó en cuenta - para los fines analíticos.

En los perfiles cromatográficos aparecen sólo 3 picos correspondientes al Colesterol, β -sitosterol y Campesterol. La ausencia del Estigmasterol, se explica debido a que el contenido de éste esterol en el aceite de algodón es pequeño; de 0 a 2.5% (ver Tabla I) (9), además el proceso de hidrogenación del aceite, probablemente ha convertido al estigmasterol en β -sitosterol.

Los datos del cuadro I se presentan en dos gráficas. En la primera, los porcentajes de esterole se muestran en forma de barras. Para cada muestra la suma de las alturas de las barras es siempre 100%.

En la segunda gráfica el % de esterole VS el % de sebo para cada una de las muestras. De ésta forma se puede apreciar más claramente la variación del colesterol y β -sitosterol en función del % sebo en la mezcla.

APENDICE I

CROMATOGRAMAS I al XVI

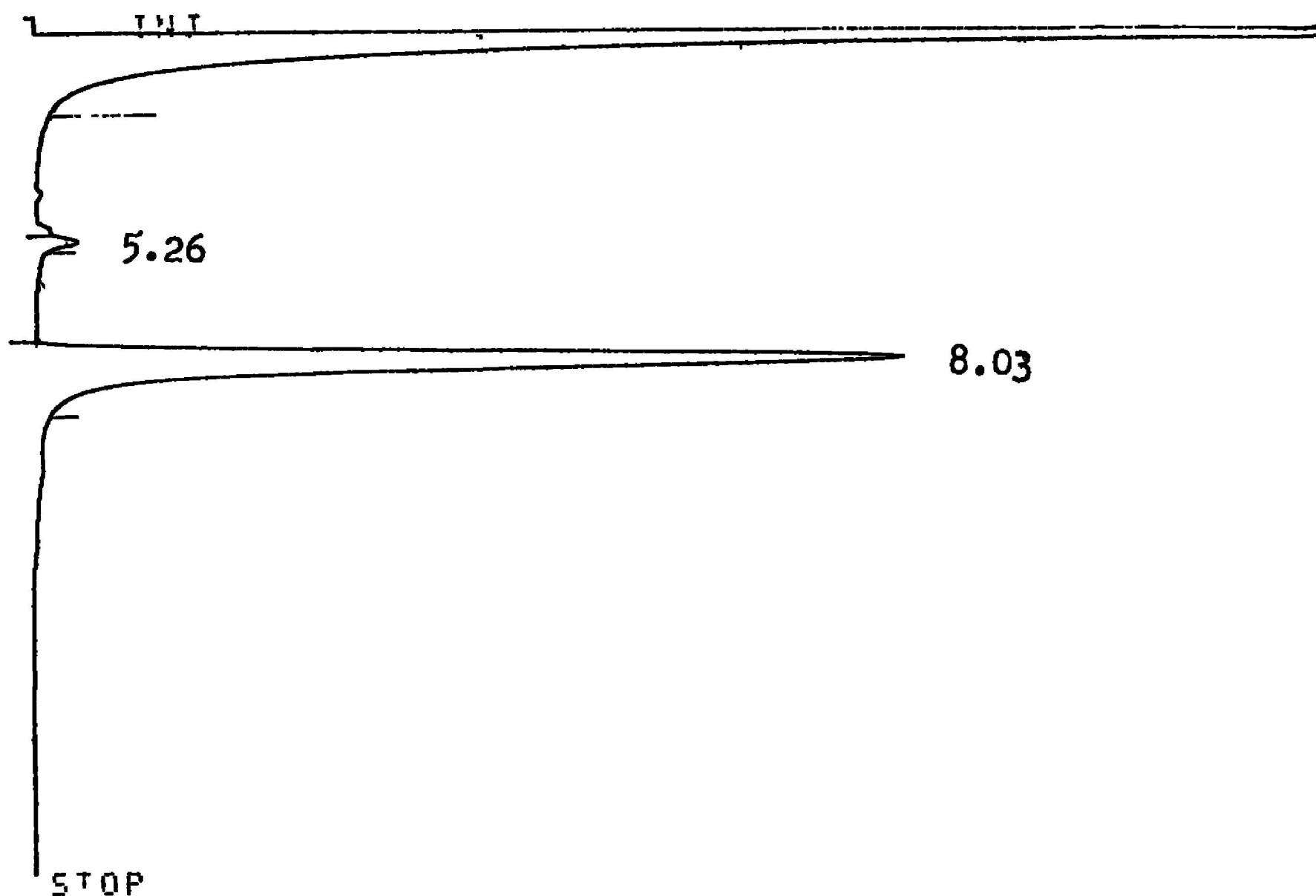
CUADRO I

GRAFICAS I Y II

CROMATOGRAMA I

26

PERFIL CROMATOGRAFICO DEL PATRON PARA IDENTIFICAR
EL PICO CORRESPONDIENTE AL COLESTEROL.



RT	AREA	AREA %
5.26	335	1.777
8.03	19626	98.22

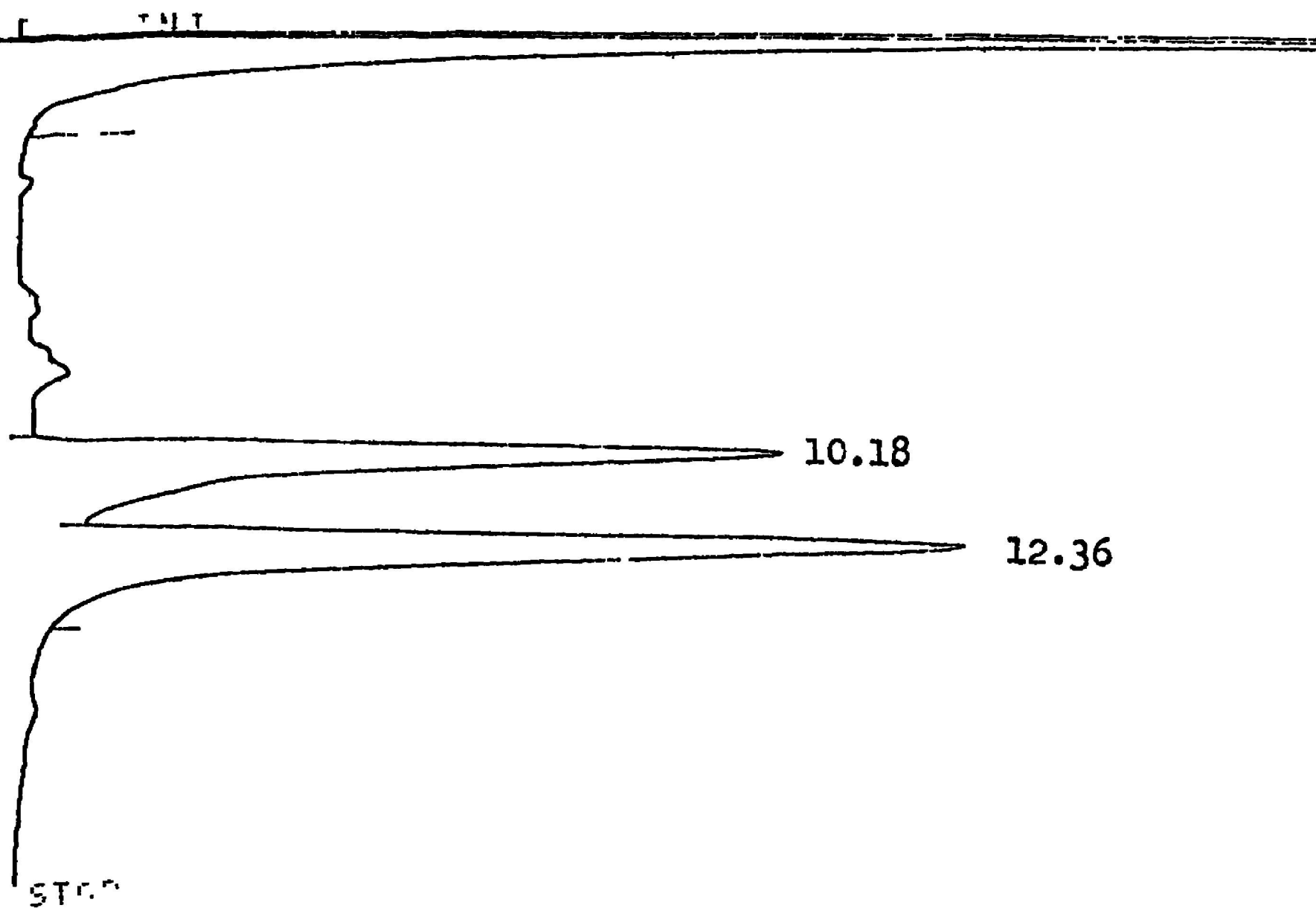
IDENTIFICACION DE LOS PICOS:

5.26 - No identificado

8.03 - Patrón de colesterol

Las condiciones se detallan en Aspectos Metodológicos.

PERFIL CROMATOGRAFICO DE LA MEZCLA DE PATRONES CORRESPONDIENTES AL β -SITOSTEROL Y CAMPESTEROL.



RT	AREA	AREA %
10.18	25005	43.02
12.36	33116	56.98

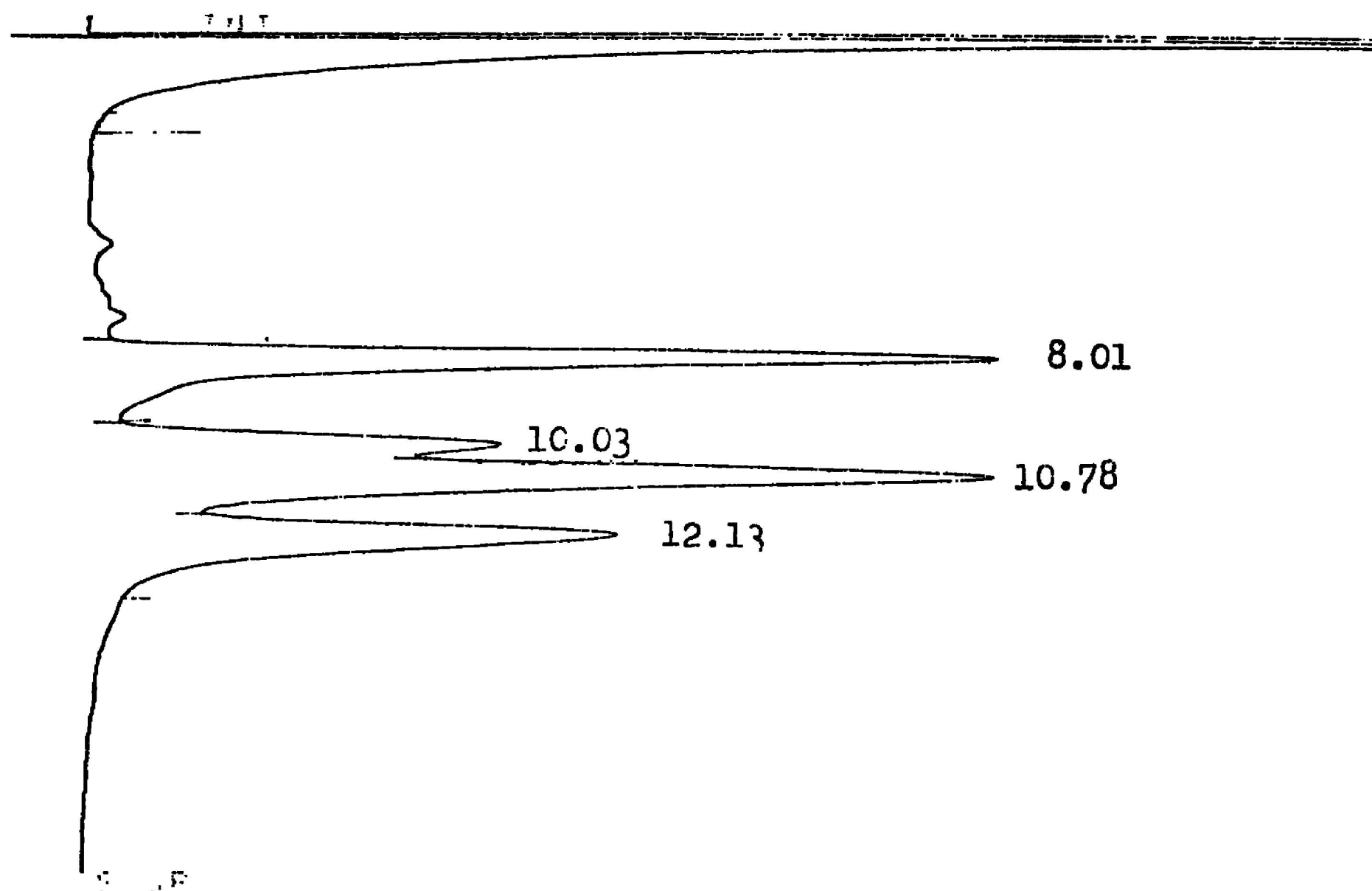
IDENTIFICACION DE LOS PICOS:

10.18 - Campesterol

12.36 - β -Sitosterol

Las condiciones se detallan en "Aspectos Metodológicos".

PERFIL CROMATOGRAFICO DELA MEZCLA DE PATRONES CORRESPONDIENTES AL COLESTEROL, β -SITOSTEROL, CAMPESTEROL Y ESTIGMASTEROL.



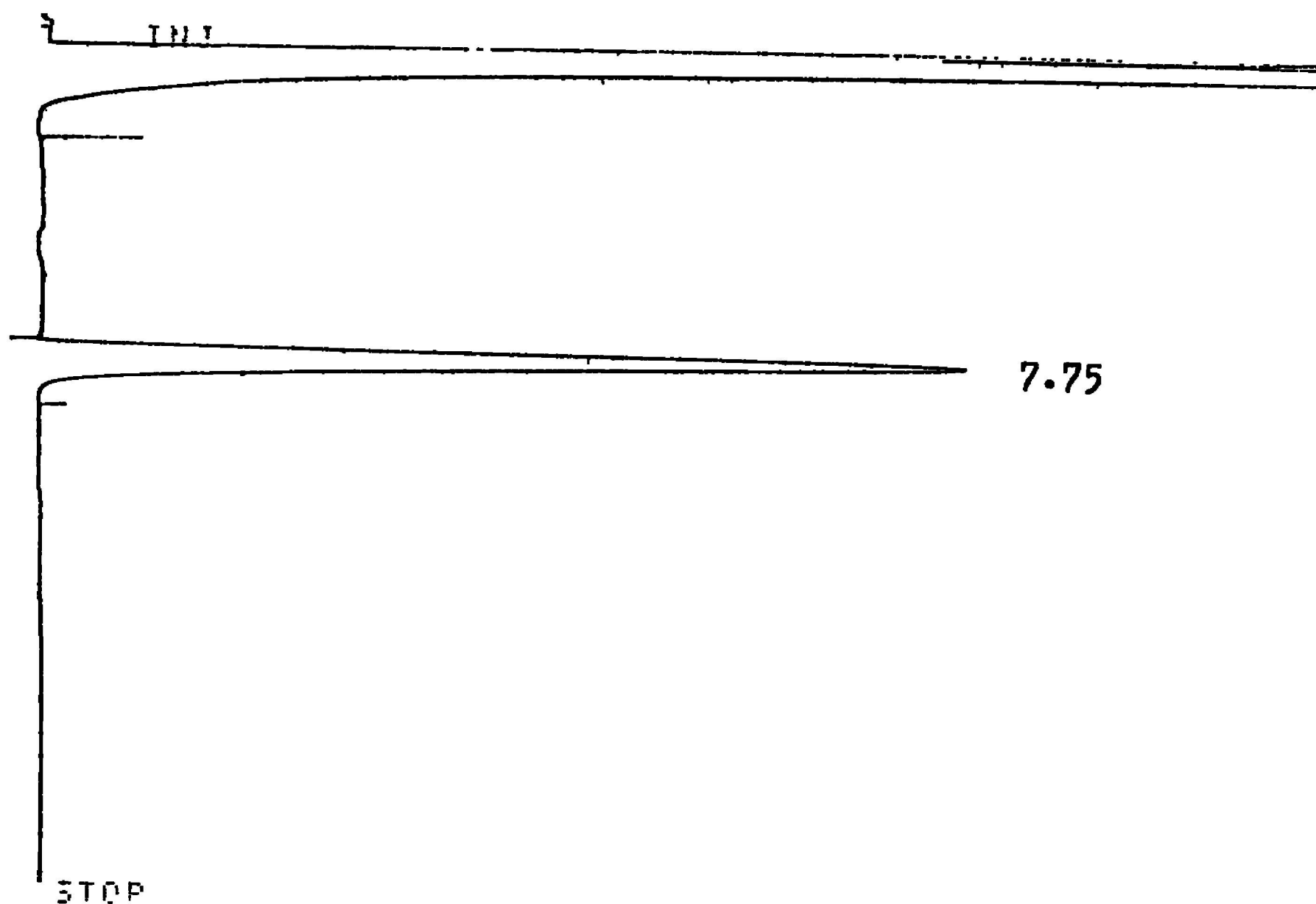
RT	AREA	AREA %
8.01	20795	28.48
10.03	8615	11.8
10.78	26569	36.39
12.13	17033	23.33

IDENTIFICACION DE LOS PICOS:

8.01 - Colesterol
10.03 - Campesterol
10.78 - Estigmasterol
12.13 - β -Sitosterol.

Las condiciones se detallan en "Aspectos Metodológicos".

PERFIL CROMATOGRAFICO DE SEBO 100% PURO



RT	AREA	AREA %
7.75	17155	100

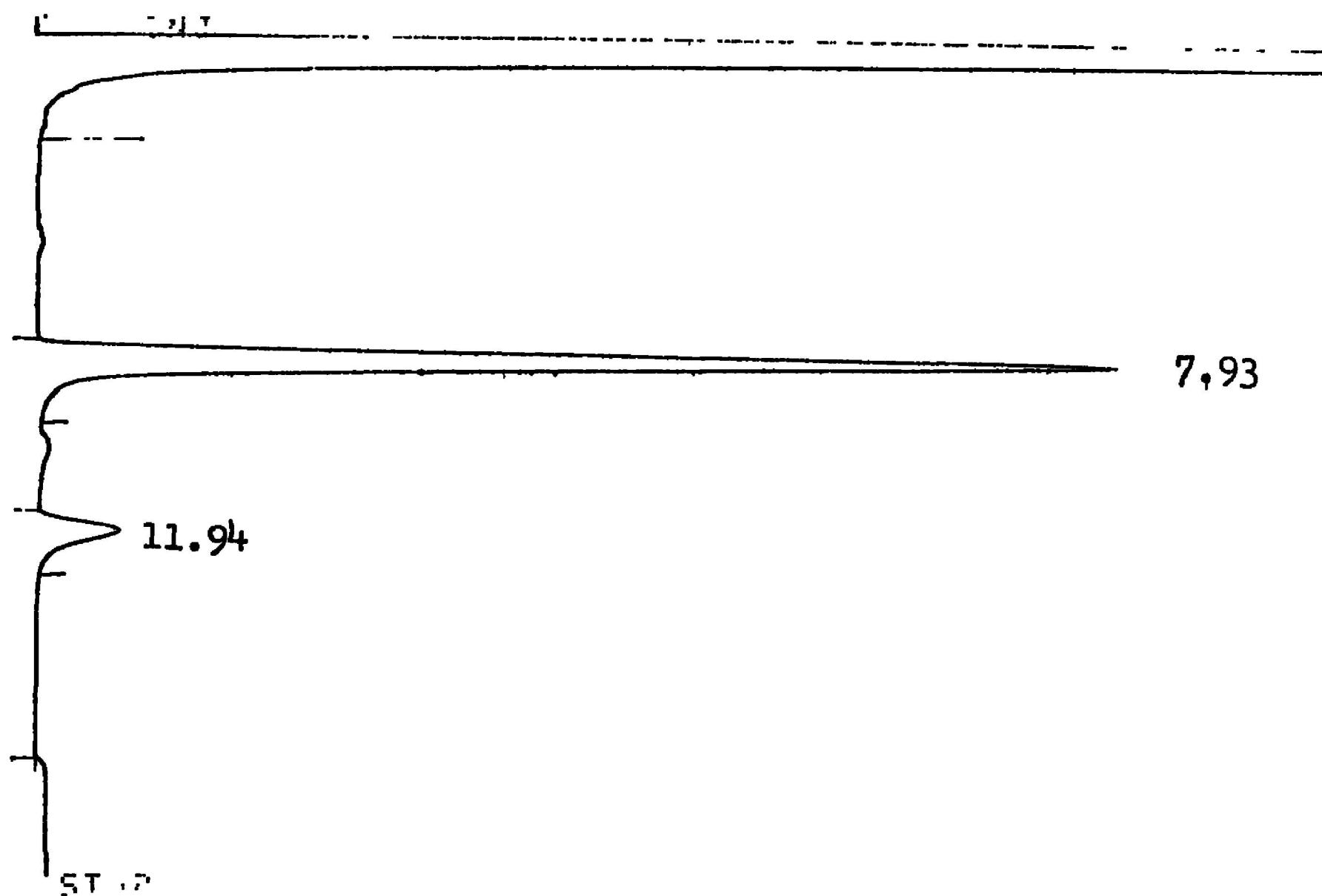
IDENTIFICACION DE LOS PICOS:

7.75 - Colesterol.

Las condiciones se detallan en "Aspectos Metodológicos".

CROMATOGRAMA V

PERFIL CROMATOGRAFICO DE UNA MEZCLA DE 95% DE SEBO MAS 5%
DE ACEITE DE ALGODON HIDROGENADO.



RT	AREA	AREA %
7.93	18237	88.73
11.94	2316	11.27

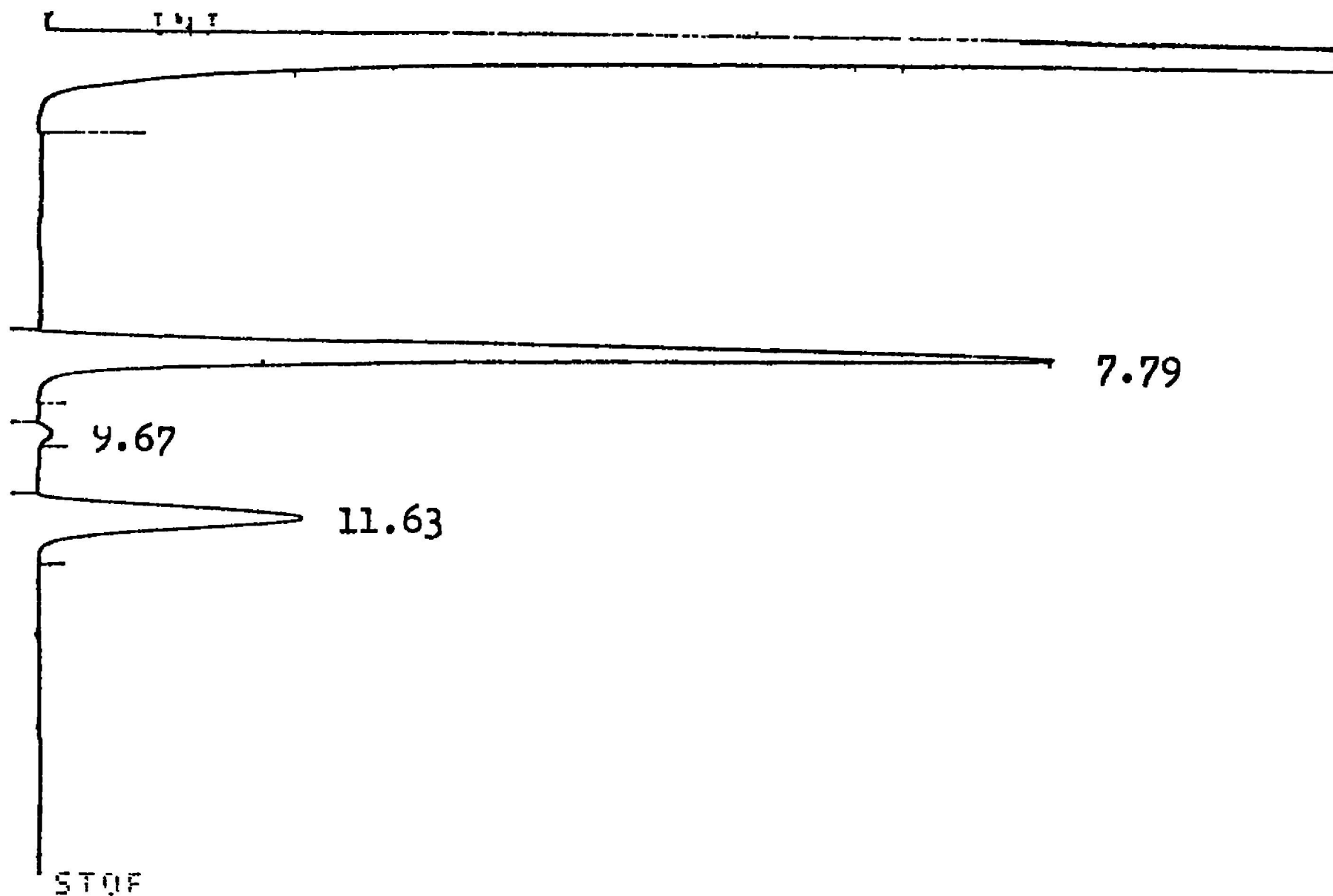
IDENTIFICACION DE LOS PICCS:

7.93 - Colesterol

11.94 - β -Sitosterol.

Las condiciones se detallan en "Aspectos Metodológicos".

PERFIL CROMATOGRAFICO DE UNA MEZCLA DE 90% DE
SEBO MAS 10% DE ACEITE DE ALGODON HIDROGENADO.



RT	AREA	AREA %
7.79	19406	72.86
9.67	226	.84
11.63	7004	26.3

IDENTIFICACION DE LOS PICOS:

7.79 - Colesterol

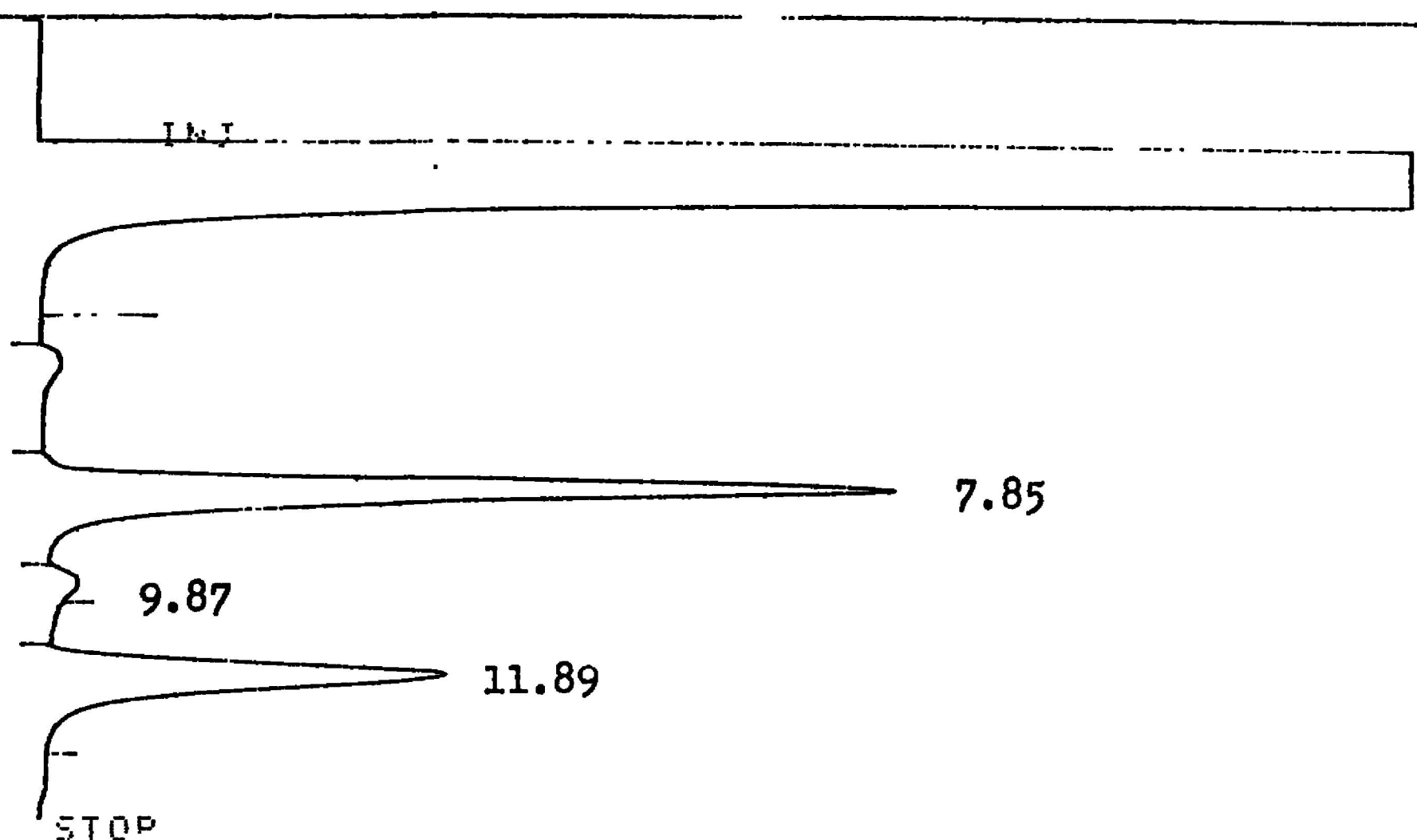
9.67 - Campesterol

11.63 - β -sitosterol.

Las condiciones se detallan en "Aspectos Metodol6gicos".

CROMATOGRAMA VII

PERFIL CROMATOGRAFICO DE UNA MEZCLA DE 80% DE
SEBO MAS 20% DE ACEITE DE ALGODON HIDROGENADO.



RT	AREA	AREA %
7.85	19548	61.94
9.87	574	1.82
11.89	11436	36.24

IDENTIFICACION DE LOS PICOS:

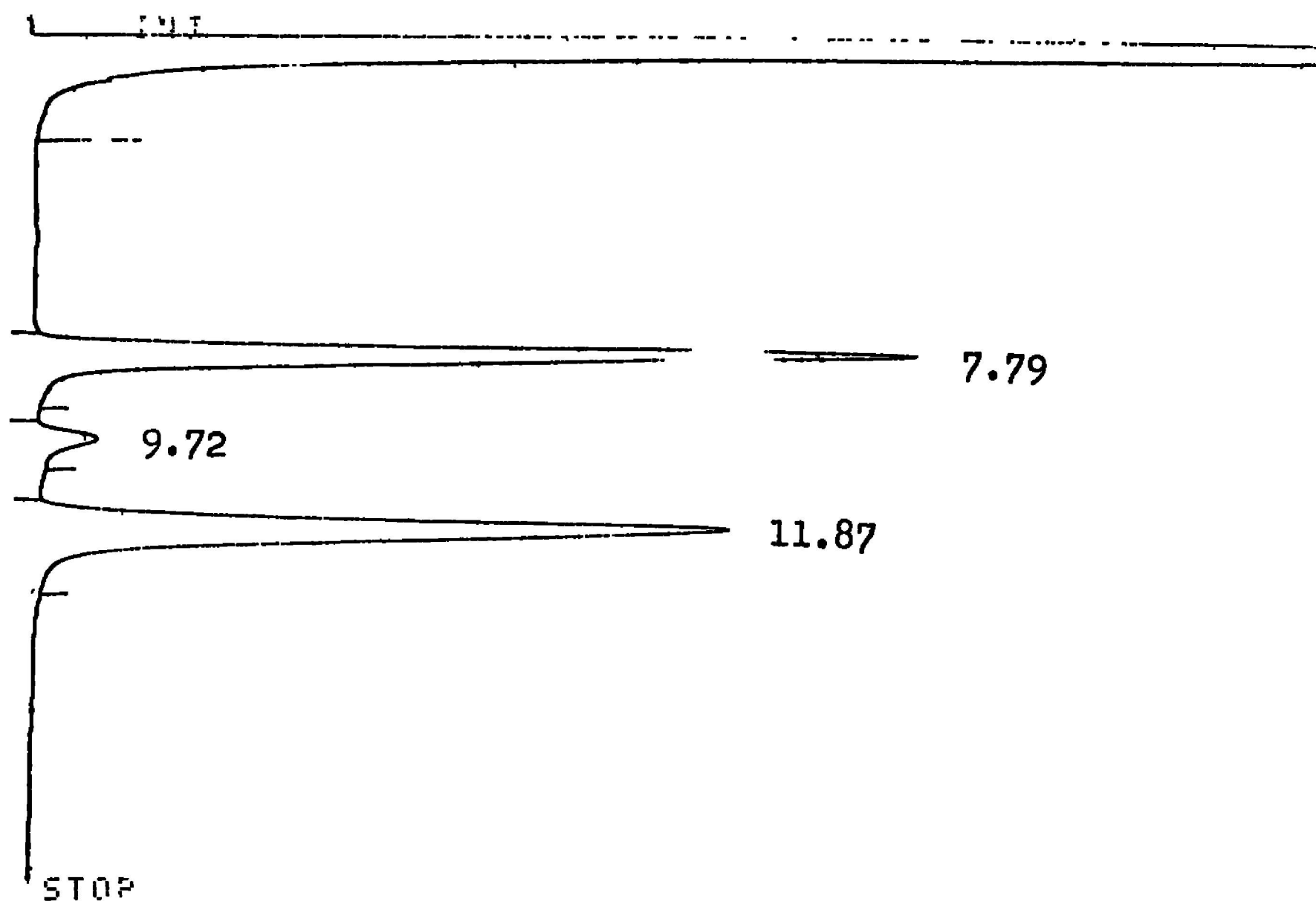
7.85 - Colesterol

9.87 - Campesterol

11.89 - β -sitosterol

Las condiciones se detallan en "Aspectos Metodológicos".

PERFIL CROMATOGRÁFICO DE UNA MEZCLA DE 70% DE
SEBO MAS 30% DE ACEITE DE ALGODON HIDROGENADO.



RT	AREA	AREA %
7.79	14316	44.1
9.72	1248	3.85
11.87	16896	52.05

IDENTIFICACION DE LOS PICOS:

7.79 - Colesterol

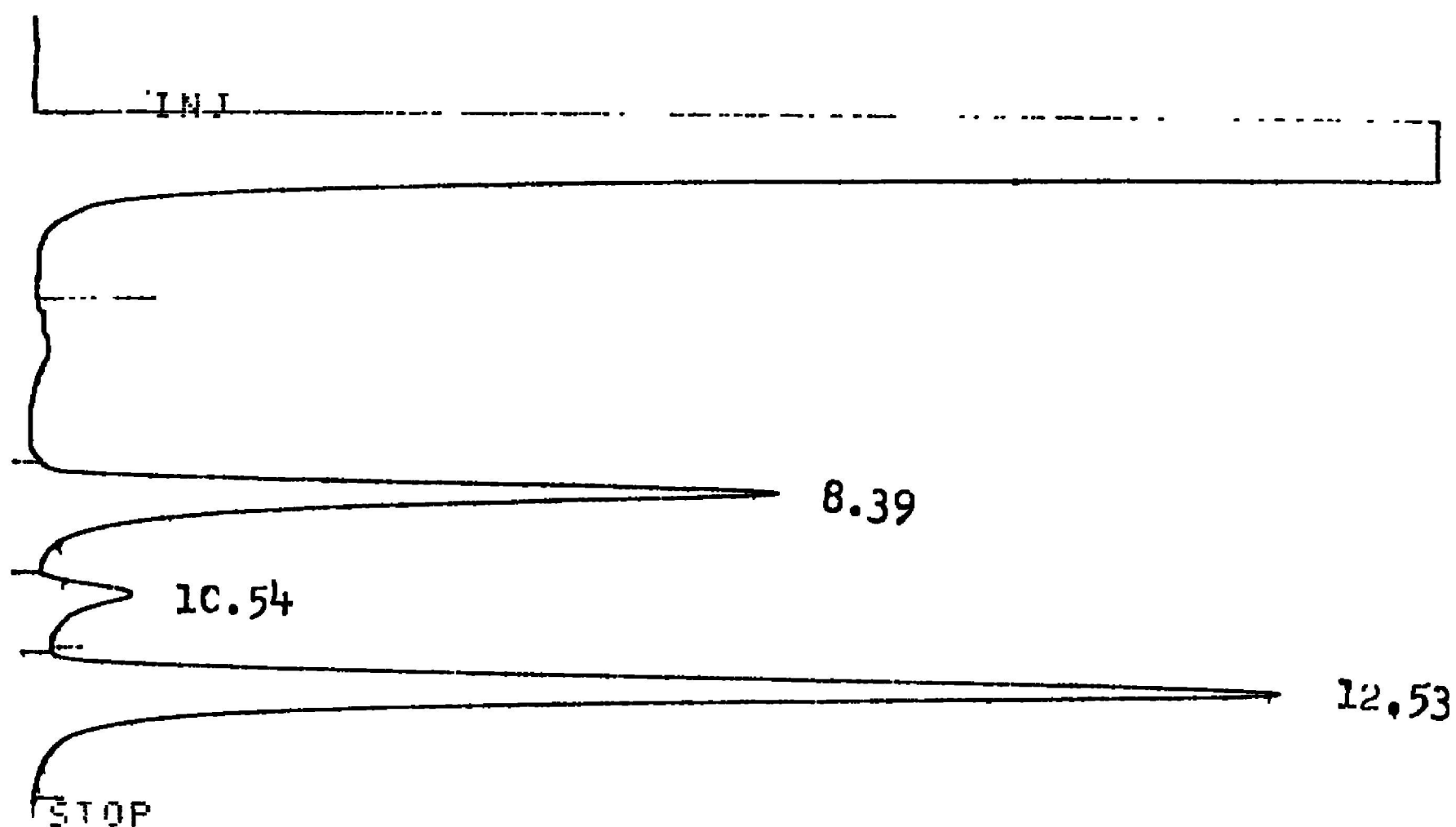
9.72 - Campesterol.

11.87 - β -sitosterol.

Las condiciones se detallan en "Aspectos Metodológicos".

CROMATOGRAMA, IX

PERFIL CROMATOGRAFICO DE UNA MEZCLA DE 60% DE
SEBO MAS 40% DE ACEITE DE ALGODON HIDROGENADO.



RT	AREA	AREA %
8.39	16535	32.92
10.54	2280	4.54
12.53	31407	62.54

IDENTIFICACION DE LOS PICOS;

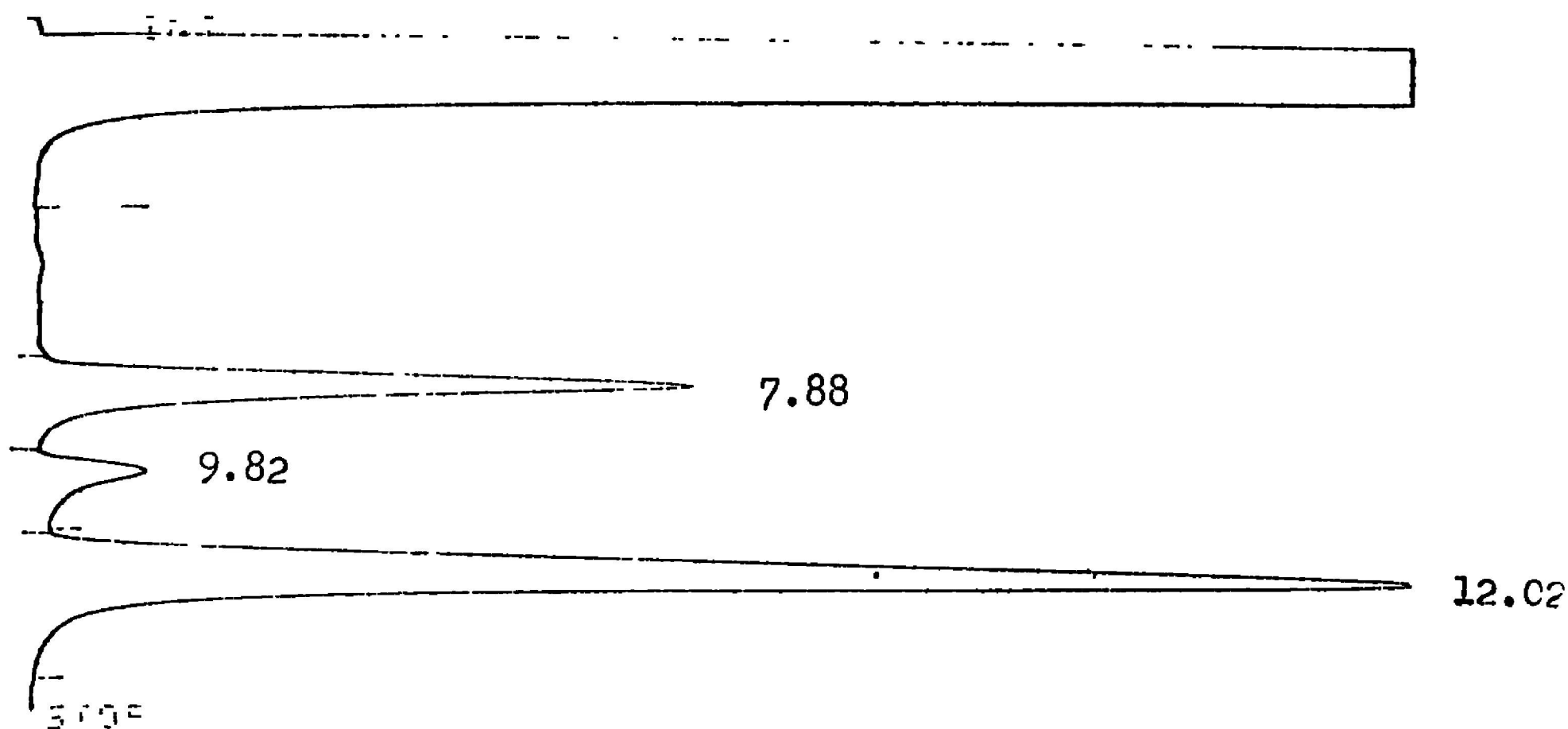
8.39 - Colesterol

10.54 - Campesterol

12.53 - β -sitosterol

Las condiciones se detallan en "Aspectos Metodológicos".

PERFIL CROMATOGRAFICO DE UNA MEZCLA DE 50%
DE SEBO MAS 50% DE ACEITE DE ALGODON HIDROGENADO.



RT	AREA	AREA%
7.88	14436	25.24
9.82	2818	4.93
12.02	39944	69.83

IDENTIFICACION DE LOS PICOS:

7.88 - Colesterol

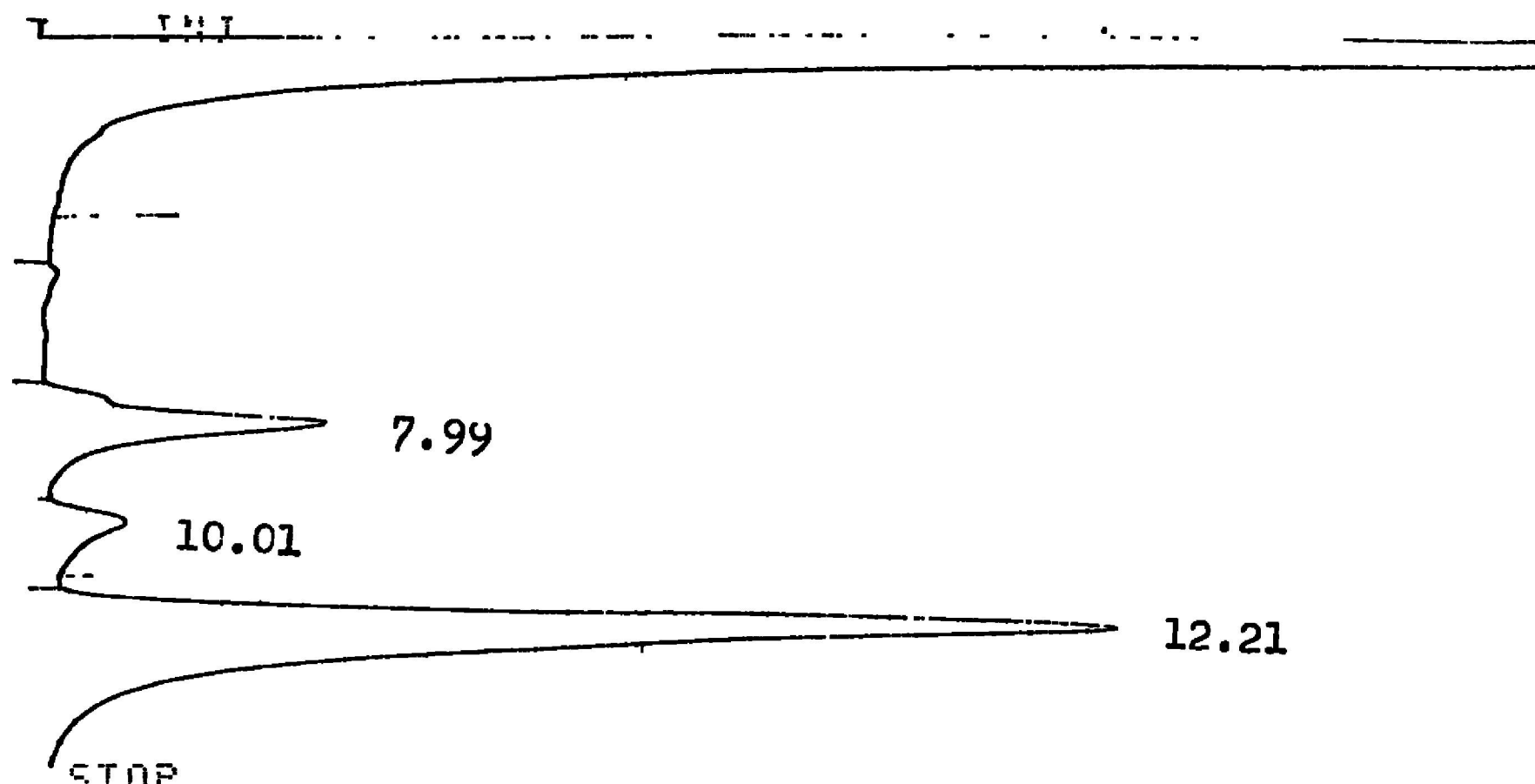
9.82 - Campesterol

12.02 - β -sitosterol

Las condiciones se detallan en "Aspectos Metodol6gicos".

CROMATOGRAMA XI

PERFIL CROMATOGRAFICO DE UNA MEZCLA DE 40% DE
SEBO MAS 60% DE ACEITE DE ALGODON HIDROGENADO.



RT	AREA	AREA %
7.99	7470	16.63
10.01	2128	4.74
12.21	35313	78.63

IDENTIFICACION DE LOS PICOS:

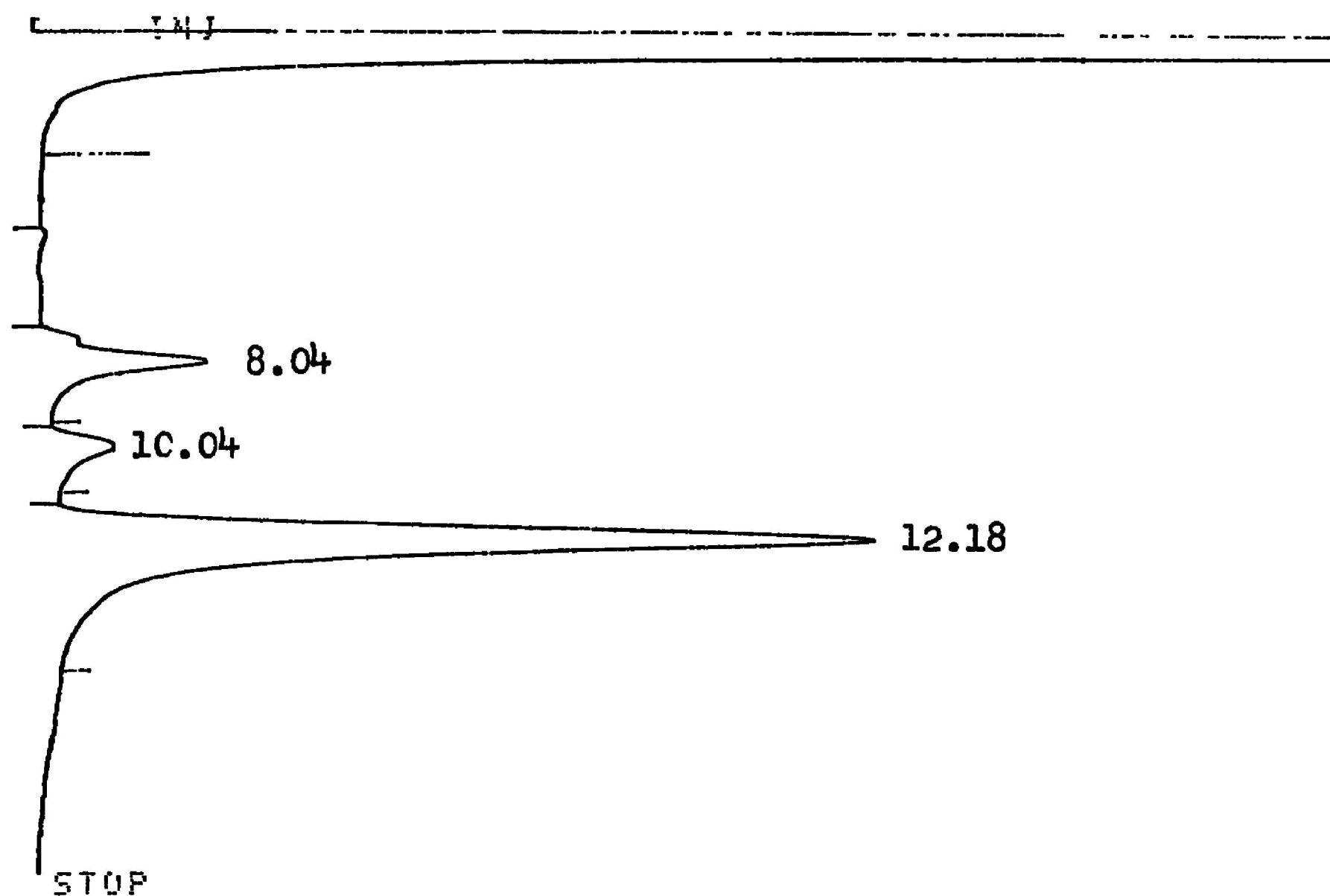
7.99 - Colesterol

10.01 - Campesterol

12.21 - β -sitosterol

Las condiciones se detallan en "Aspectos Metodológicos".

PERFIL CROMATOGRAFICO DE UNA MEZCLA DE 30% DE
SEBO MAS 70% DE ACEITE DE ALGODON HIDROGENADO.



RT	AREA	AREA %
8.04	4900	13.5.
10.04	1883	5.19
12.18	29512	81.31

IDENTIFICACION DE LOS PICOS:

8.04 - Colesterol

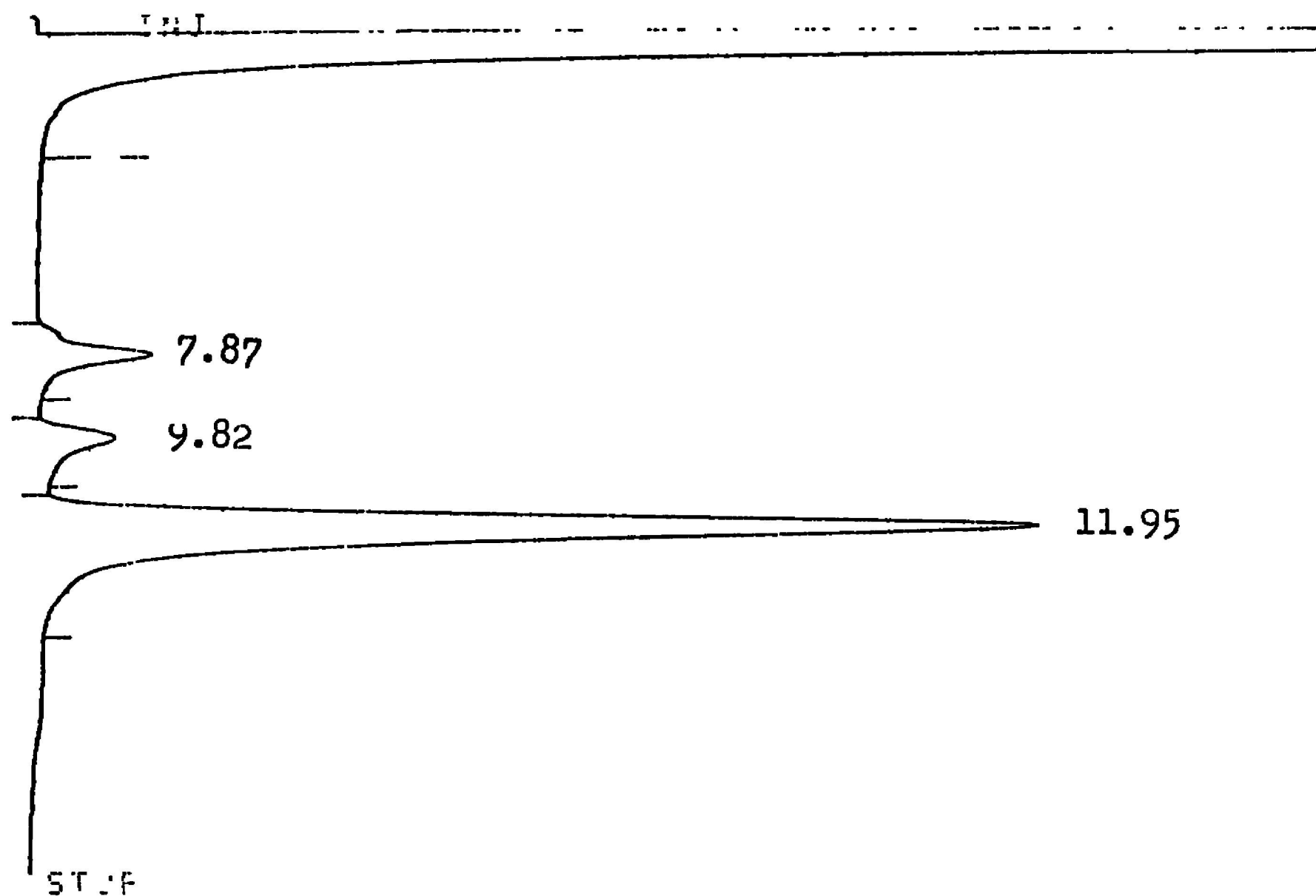
10.04 - Campesterol

12.18 - β -sitosterol.

Las condiciones se detallan en "Aspectos Metodológicos".

CROMATOGRAMA XIII

PERFIL CROMATOGRAFICO DE UNA MEZCLA DE 20% DE
SEBO MAS 80% DE ACEITE DE ALGODON HIDROGENADO.



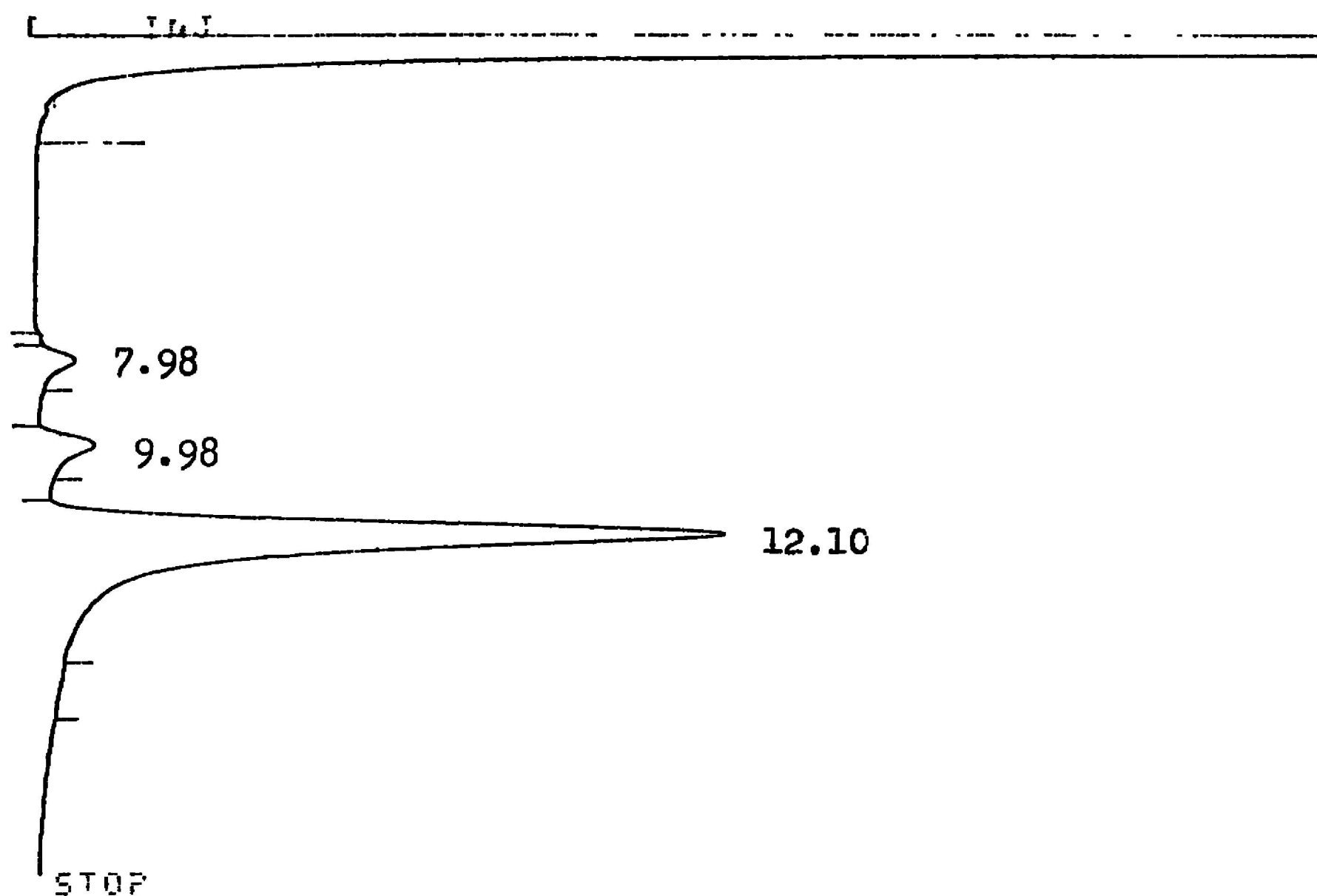
RT	AREA	AREA %
7.87	2990	8.11
9.82	2154	5.85
11.95	31717	86.04

IDENTIFICACION DE LOS PICOS:

- 7.87 - Colesterol
- 9.82 - Campesterol
- 11.95 - β sitosterol

Las condiciones se detallan en "Aspectos metodológicos".

PERFIL CROMATOGRÁFICO DE UNA MEZCLA DE 10% DE
SEBO MAS 90% DE ACEITE DE ALGODON HIDROGENADO.



RT	AREA	AREA %
7.98	765	2.74
9.98	1454	5.20
12.10	25705	92.06

IDENTIFICACION DE LOS PICOS:

7.98 - Colesterol

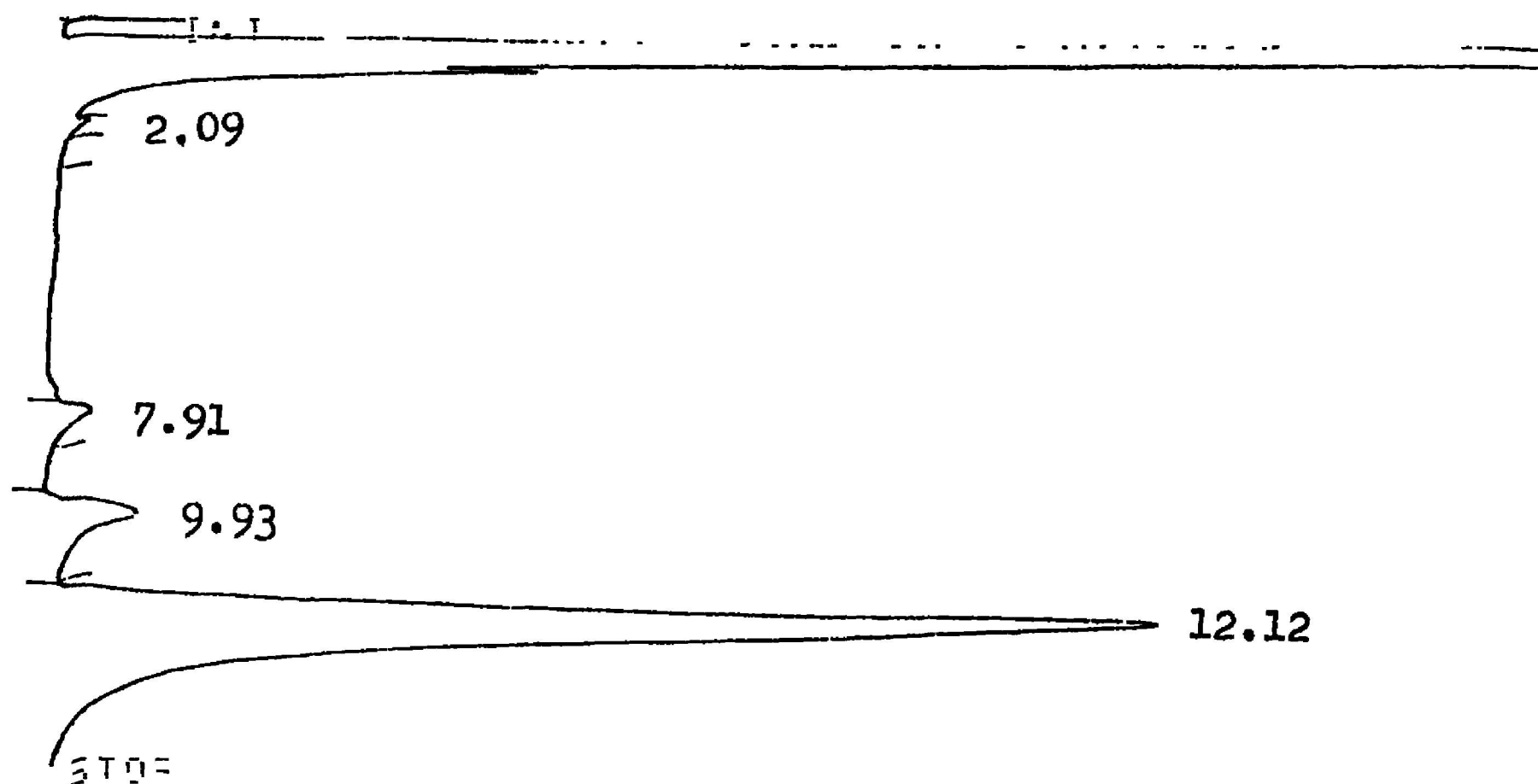
9.98 - Campesterol

12.10 - β -sitosterol.

Las condiciones se detallan en "Aspectos Metodológicos".

CROMATOGRAMA XV

PERFIL CROMATOGRAFICO DE UNA MEZCLA DE 5% DE
SEBO MAS 95 % DE ACEITE DE ALGODON HIDROGENADO.



RT	AREA	AREA %
7.91	711	1.81
9.93	2373	6.03
12.12	36253	92,16

IDENTIFICACION DE LOS PICOS:

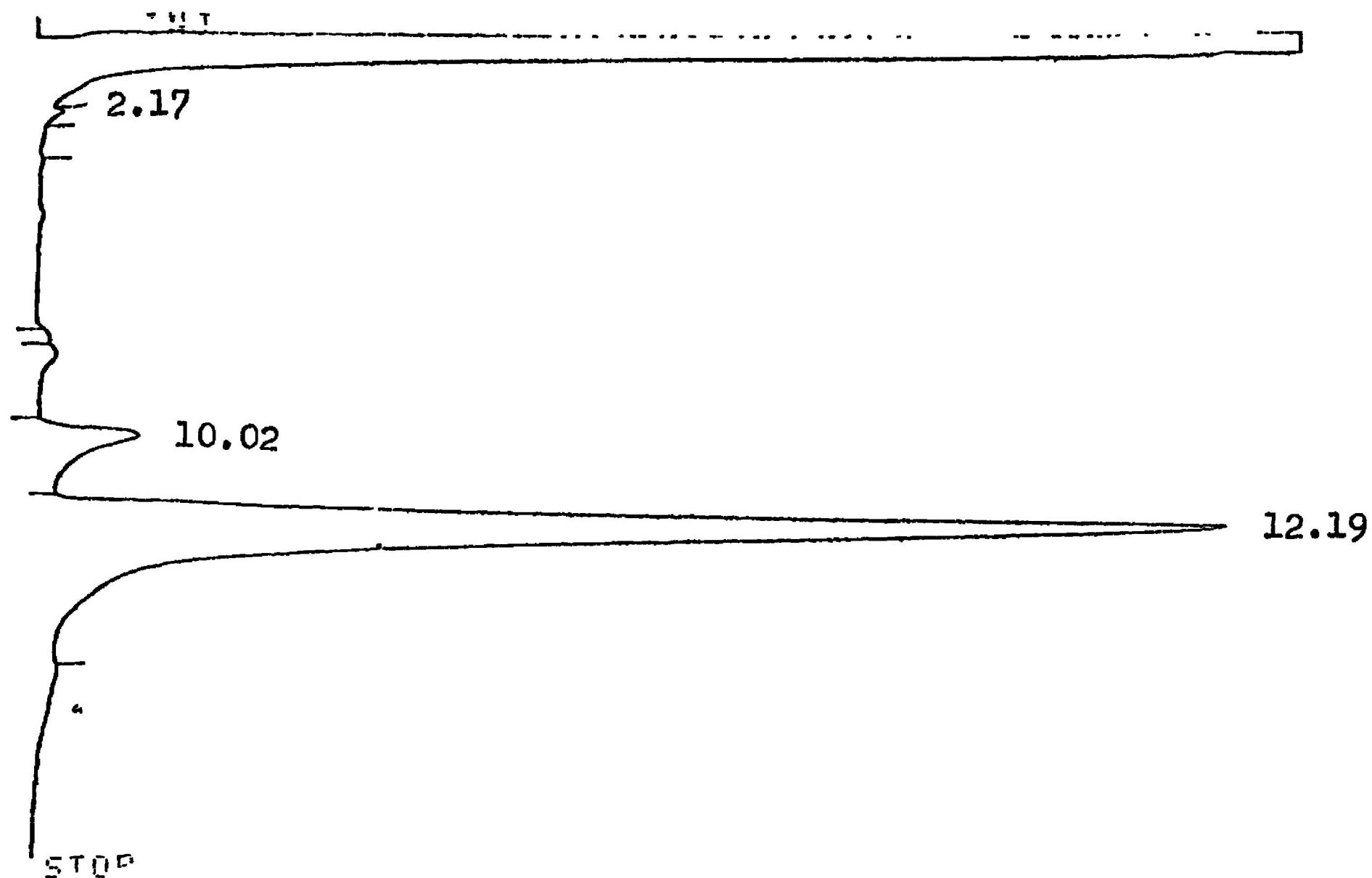
7.91 - Colesterol

9.93 - Campesterol

12.12 - β -sitosterol.

Las condiciones se detallan en "Aspectos Metodológicos".

PERFIL CROMATOGRAFICO DE ACEITE DE ALGODON
HIDROGENADO 100% PURO.



RT	AREA	AREA %
10.02	3436	7.31
12.19	43572	92.69

IDENTIFICACION DE LOS PICOS:

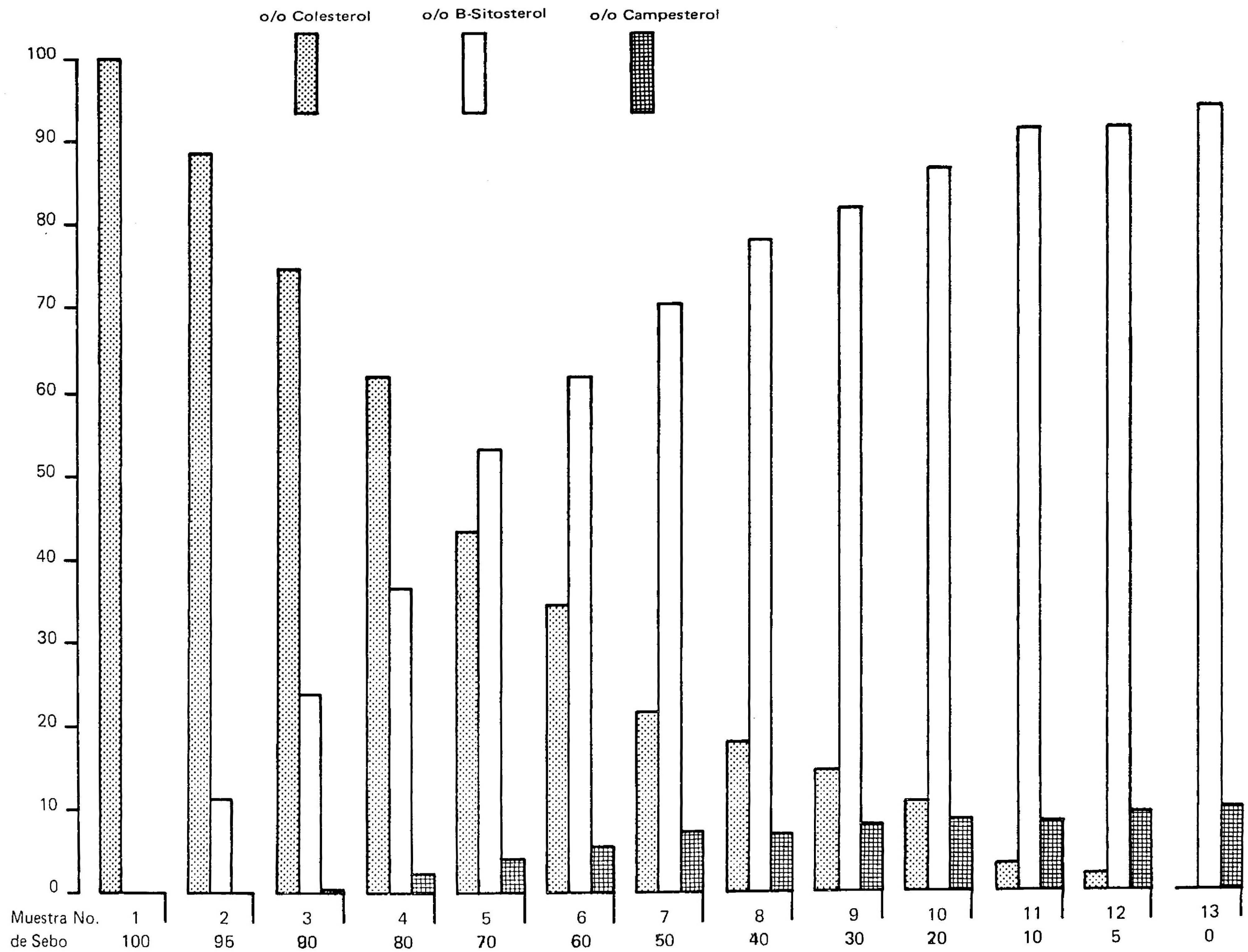
10.02 - Campesterol

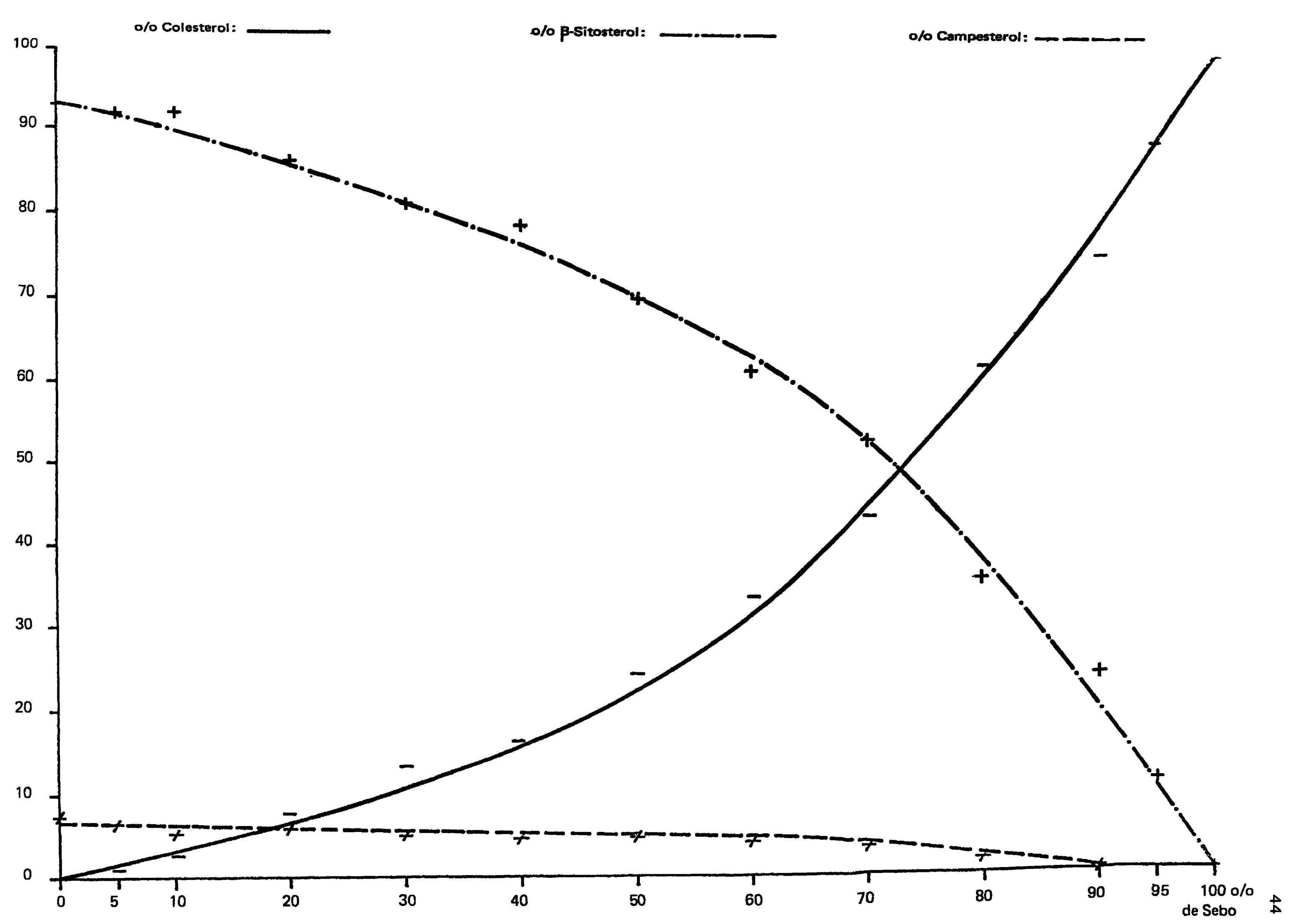
12.19 - β -sitosterol.

Las condiciones se detallan en "Aspectos Metodológicos".

CUADRO I

No.	% SEBO	% ACEITE VEGETAL HIDROGENADO	PROMEDIO % COLESTEROL	PROMEDIO % CAMPESTEROL	PROMEDIO % β -SITOSTEROL
1	100		100		
2	95	5	89.02		10.98
3	90	10	75.55	0.43	24.04
4	80	20	62.14	1.80	36.05
5	70	30	43.55	3.40	53.05
6	60	40	33.90	4.41	61.61
7	50	50	24.85	4.92	70.24
8	40	60	16.59	4.59	78.84
9	30	70	13.58	5.16	81.26
10	20	80	7.90	5.94	86.17
11	10	90	2.75	5.30	91.96
12	5	95	1.69	6.57	91.74
13		100		7.27	92.73





DISCUSION

Los datos extraídos de los perfiles cromatográficos de las mezclas tabuladas en el cuadro I son admisibles. En el cuadro I se observa que al aumentar la proporción del sebo en la mezcla, aumenta el porcentaje de colesterol en la fracción de esteroides. De igual manera, al incrementar la proporción de manteca vegetal en la mezcla, aumenta el porcentaje de fitosteroides.

El cromatograma No. III, muestra los picos de los patrones de colesterol, campesterol, estigmasterol y β -sitosterol. Es evidente que la columna utilizada resuelve nitidamente el colesterol y el β -sitosterol. Sin embargo los picos de campesterol y estigmasterol aparecen superpuestos. Para el presente estudio esto no es un serio impedimento. En general el contenido de Estigmasterol en el aceite de algodón se encuentra en cantidades que representan entre 0.0 y 2.5% (ver tabla I) de la fracción total de esteroides.

Además, desde que las muestras se han obtenido de aceite de algodón hidrogenado, es probable que el estigmasterol haya sido transformado en β -sitosterol en el pro -

proceso de reducción. Los cromatogramas de la muestra corroboran ésta suposición pues el pico del campesterol no aparece distorsionado en ninguno de los perfiles cromatográficos de las muestras.

Al extremo de la curva, (cuadro I) en la muestra pura de sebo no aparece en el perfil cromatográfico señales correspondientes a los fitosteroles. La muestra No.2 correspondiente a la mezcla constituida por 95% de sebo y 5% de manteca vegetal, muestra una composición esterolica de 88.73% de colesterol y 11.94% de β -sitosterol. Estas cifras indican que es posible determinar fácilmente una adulteración del sebo con manteca vegetal a un nivel del 5%. Es más; observando la curva del colesterol en la gráfica II se puede concluir que 1% de manteca vegetal en una muestra de sebo ésta dentro del límite de detección del presente método. Interpolando en la curva, 1.0% de manteca vegetal equivale alrededor de 2.0% de β -sitosterol en la fracción esterolica. Desde que en los perfiles cromatográficos es posible observar picos que representan 1.0% de esteroles, es claro que 1.0% de manteca vegetal puede ser fácilmente detectado.

Al otro extremo de la curva, está la muestra pura de aceite vegetal hidrogenado. En el perfil cromatográfico de ésta muestra se observan dos pequeños picos superpuestos que escapan la detección de la integradora electrónica. El tiempo de retención de éstos pequeños picos coincide aparentemente con el tiempo de retención del colesterol. Sin embargo el área de ambos picos debe constituir una fracción a lo más del 1.0%. La muestra siguiente, aquella constituida por 95% de manteca vegetal y 5% de sebo, sí presenta un pico definido en el punto correspondiente al colesterol. El área del pico representa 1.81% de la fracción esterolítica. Si asumimos que la técnica de C.G. permite cuantificar picos de hasta 1.0% del área total integrada, en éste caso sólo será posible detectar hasta el 3% de adulteración con sebo en una muestra de manteca vegetal.

De los datos obtenidos se desprende que la manteca vegetal contiene mayor cantidad de fitosteroles que el sebo contiene de colesterol. Debido a esto es más fácil detectar una adulteración de sebo con manteca vegetal que viceversa.

El cuadro I indica que una muestra que presenta la misma cantidad de colesterol y β -sitosterol (punto de intersección de las curvas respectivas) tiene una composición aproximada de 72% de sebo y 28% de manteca vegetal.

Los datos del cuadro I relativos al % de colesterol pueden ser acomodados estadísticamente por una ecuación de segundo grado del tipo $Y = B_0 + B_1 X + B_2 X^2$.

El resultado de este análisis se presenta en el siguiente cuadro.

ANALISIS DE REGRESION DE 2° GRADO

<u>% DE SEBO</u>	<u>% DE COLESTEROL</u>
0	0
5	1.69
10	2.75
20	7.90
30	13.58
40	16.59
50	24.85
60	33.90
70	43.55
80	62.14
90	75.55
95	89.02
100	100.00

La ecuación correspondiente es:

$$Y = 2.4380 + 0.0100 X - 0.0581 X^2$$

La correlación es de 0.99549

El total de casos es: 13

El índice de la prueba de significancia de la regresión es: $F = 1103.2012$

Lo que permite asegurar la validez estadística de la ecuación.

CONCLUSIONES

Guatemala es en el presente un país productor, tanto de algodón como de carne de res, de los cuales se obtiene el aceite de algodón hidrogenado y el sebo respectivamente. Se hace entonces necesario una metodología que permita determinar los porcentajes de una mezcla de éstas grasas, y en el presente la que parece ser más adecuada es el análisis de la composición de esteroides por Cromatografía de Gas (C.G.). Esta técnica permite diferenciar con alto grado de confianza las grasas de procedencia animal, de aquellas que son exclusivamente de origen vegetal; así como determinar hasta el 2.5% de adulteración en ambos sentidos, por comparación con mezclas patrones.

También se ha encontrado que el aceite de algodón hidrogenado contiene un porcentaje mayor de fitosteroides que el porcentaje de colesterol presente en el sebo; por lo tanto es posible detectar con mayor sensibilidad el aceite de algodón presente en grasas de origen animal, que viceversa, (aunque la técnica funciona perfectamente en ambos sentidos).

Se ha verificado además, que el colesterol presente en el aceite de algodón hidrogenado se encuentra, únicamente en cantidad de trazas, corroborando los reportes - de otros investigadores, por lo que el método anteriormente descrito puede ser utilizado con toda confianza.

RECOMENDACIONES

En el aspecto metodológico se recomienda efectuar ensayos para mejorar la resolución entre el campesterol y el estigmasterol. Específicamente se podría utilizar columnas de mayor longitud o bien emplear el relleno - OV-17 mencionado con mayor frecuencia en los reportes - de literatura.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C. Official methods of analysis of the AOAC. 12th ed. Washington, D.C., 1975. pp. 500-501.
- 2.- Beerthuis, R. K. y J. H. Recourt. "Sterol analysis by gas chromatography". Nature, 5(186):372-374. 1960.
- 3.- Eisner, J.; N. P. Wong, D. Firestone y J. Bond. "Gas chromatography of unsaponifiable matter. I. Butter and margarine sterols". J. Assoc. Off. Agric. Chem., 45(2):337-342. 1962.
- 4.- Ettinger, C. L.; A. J. Malanowski y H. Kirschenbaum. "Oils, fats and waxes; detection and estimation of animal fats in vegetable oils by gas chromatography". J. Assoc. Off. Agric. Chem., 48(6):1186-1191. 1965.
- 5.- Firestone, D. "A review of methods for determining pesticides residues, contaminants and adulterants in fats and oils". J. Am. Oil Chem. Soc., 45:210A-214A, 245A-247A. 1968.
- 6.- Firestone, F. "Report on oils, fats and waxes". J. Assoc. Off. Anal. Chem., 49(1):71-73. 1966.
- 7.- Handbook of biochemistry; selected data for molecular biology. Cleveland, Ohio, Chemical rubber Co. /c1968/ p. f-16.

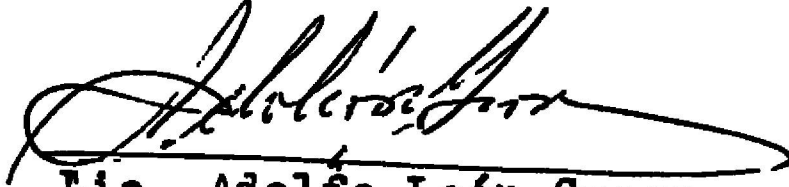
- 8.- Instituto Centroamericano de Investigación y Tecnología Industrial. Aceites y grasas comestibles; determinación de la adulteración de las grasas vegetales con grasas animales. Guatemala, 1974. p. 7. (Norma Centroamericana ICAITI 34 072 h18).
- 9.- Mordret, F.; A. Prevot y J. P. Wolff. "Les différentes methodes de determination de la composition sterolique et leur application a l'analyse des corps gras". Ann. Fals. Exp. Chim., 70(750):87-100. 1977.
- 10.- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Organización Mundial de la Salud. Norma general internacional recomendada para las grasas y aceites comestibles; no regulados por normas individuales del codex. Programa conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias; comisión del codex alimentarius. Roma, 1970. 20 p. (FAO, Comisión del Codex Alimentarius, CAC/RS 19-1969).
- 11.- Recourt, J. H. y R. K. Beerthuis. "Detection of animal fat in vegetable fat by gaschromatographyc analysis". En: Determination of sterols. Papers presented at a meeting in May 1962. London, Society for Analytical Chemistry, 1964. pp. 30-37. (Monograph No.2).

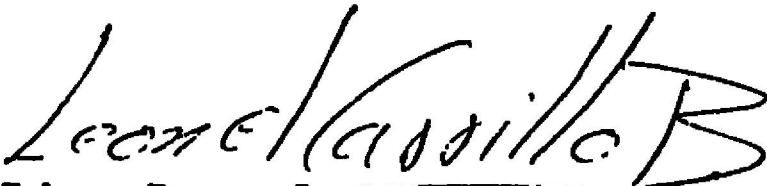
JOSE ROBERTO BENAVIDES SOZA

Ve. Bo.


Lic. Elsa C. de Reyes
Asesor.

IMPRIMASE


Lic. Adolfo León Gross
Director de la Escuela de Química


Lic. Leonel Carrillo
Decano.