

**Proyecto de Innovación Docente 2019-2020**  
**Herramienta TAPA**  
**Trabajo de Aplicación Práctica para el Alumnado**

**Grado: Grado en Farmacia**

.....  
**Módulo:** .....

**Materia:** .....

**Facultad: Facultad de Farmacia**

.....  
**Curso: 2º** .....

**Asignatura: Química analítica II**

.....  
**TAPA: Pincho de salmón**

.....

**TAREA 1.**

**Elección de la técnica instrumental**

Analitos: omega 3, ácido graso insaturado del salmón correspondiente a nuestra tapa.

**Proceso de extracción: Extracción por fluidos supercríticos (SFE), ya que es la técnica mas rápida y que mayor pureza nos dará (aunque sea la mas costosa).**

Otros métodos de extracción serían: por el método convencional (mediante prensado húmedo o por solventes) y por ensilaje.

**Proceso de análisis: Cromatografía de líquidos: técnica con la que se obtendrán elementos de mayor pureza.**

Otros métodos para la extracción serían: por hibernación (cristalización parcial del aceite mediante enfriamiento controlado, seguido de filtración) y fraccionamiento por métodos supercríticos (poco efectivo, posiblemente debido a la compleja estructura del aceite de pescado).

Una técnica alternativa no instrumental para determinar el contenido en omega 3 del salmón sería llevando a cabo una valoración alcalina. Este método se realizaría en varios pasos. En primer lugar, los ácidos grasos se oxidarán gracias al  $\text{KMnO}_4$  usando  $\text{H}_2\text{SO}_4$  como catalizador. En segundo lugar, el ácido propanoico como resultado de la oxidación se separará por destilación. Por último, sería necesario titular este ácido propanoico destilado. Aunque este método es muy barato su gran desventaja es que tiene un 45% de error.

## TAREA 2.

### Descripción del fundamento de la técnica

1. **Extracción:** Utilizamos una técnica basada en el prensado húmedo del pescado para poder obtener el aceite de este. Este prensado húmedo se lleva a cabo primero con una cocción del pescado para seguidamente proceder al prensado. A continuación, se decanta para finalmente concluir este prensado húmedo con la centrifugación por fluidos supercríticos.
2. **Refinación**, que consiste en la eliminación de purezas.
3. **Concentración:** para separar los distintos componentes del aceite del pescado y poder así, cuantificar el omega 3 se utiliza una cromatografía de líquidos en fase reversa.

## TAREA 3.

### Esquema del equipo instrumental empleado

La **extracción** se realiza por métodos convencionales. La extracción de aceite de pescado mediante prensado húmedo es el método más utilizado para la producción a escala industrial y se realiza básicamente en 4 etapas:

1. Cocción del pescado
2. Prensado
3. Decantación
4. Centrifugación por fluidos supercríticos (**FSC**: cualquier sustancia que se encuentre en condiciones de presión y temperatura superiores a su punto crítico, lo que hace que se comporte como un híbrido entre un líquido y un gas, es decir, puede difundir como un gas (efusión), y disolver sustancias como un líquido) Método de extracción por solvente: extracción por fluidos supercríticos (EFSC), es una tecnología emergente debido a ventajas como el uso de temperatura moderada, ambiente libre de oxígeno y extracción de lípidos de baja polaridad, lo cual evita la extracción de impurezas. Al tener una viscosidad más baja mejora la transferencia de masa y reduce el tiempo necesario para la extracción. La mayor desventaja es el alto costo de la aplicación. El fluido más empleado es el CO<sub>2</sub>, usado como solvente inerte y seguro para la extracción de aceite. Su principal ventaja es que no permanece en el producto ya que se evapora.

La **refinación**: una vez extraídos los aceites de pescado requiere un proceso de purificación. Las impurezas en el aceite reducen su calidad y deben ser eliminadas manteniendo la mayoría de los compuestos deseables como el omega 3.

La **concentración** acidos grasos poliinsaturados en aceite de pescado:

- Fraccionamiento por métodos cromatográficos:

Los métodos cromatográficos son usados para la concentración de ácidos grasos poliinsaturados, e incluyen cromatografía líquida (HPLC), argentométrica y de fluidos supercríticos, para la obtención de productos de alta pureza.

Para la **cromatografía de fase reversa** se utiliza un sistema de elución compuesto por una mezcla acetonitrilo/éter etílico en distintas proporciones.

-Fase móvil: El acetonitrilo es el más idóneo para ser utilizado como disolvente principal puesto que con este se alcanza la mejor separación de pares críticos. Para mejorar la solubilidad se añade un disolvente secundario denominado modificador orgánico. Esto proporciona cambios en su polaridad y por lo tanto en la selectividad de los picos cromatográficos: un aumento en la polaridad de la fase móvil se refleja invariablemente en un incremento del tiempo de retención y mejora la resolución de picos incluyendo los pares críticos.

-Fase estacionaria: las fases estacionarias y de fase reversa o inversa, están compuestas por partículas de octadecilsilano, la mayoría con forma esférica y soportada en empaquetamientos de sílice, han demostrado proporcionar la mejor selectividad para ácidos grasos.

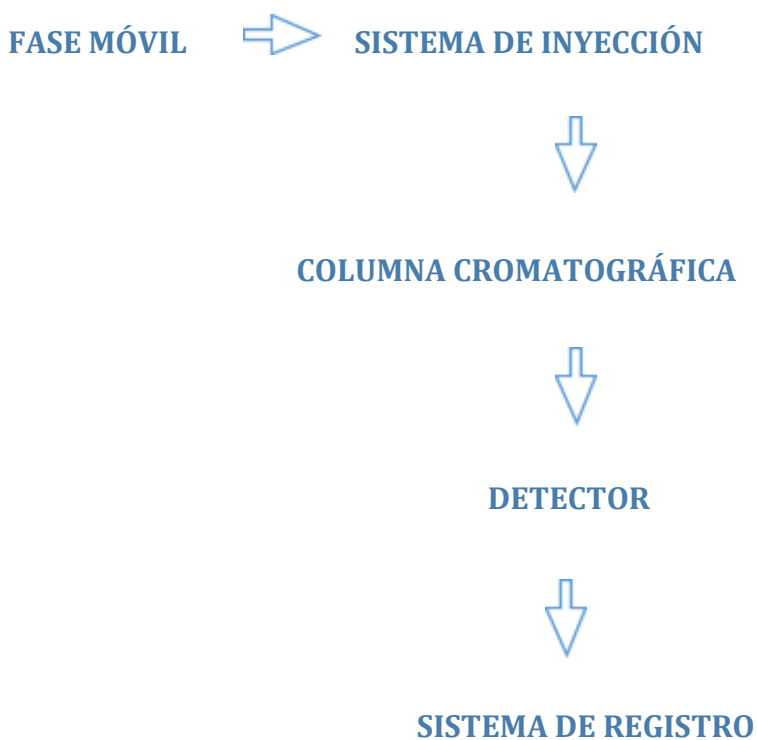
-Detectores: **El detector evaporativo de baja temperatura por dispersión de luz (LT-ELSD)** es un instrumento de alta capacidad, ideal para la detección de compuestos que no tienen grupos cromóforos, ya que no se basa en la absorción de radiación. La respuesta del detector es directamente proporcional a la masa del compuesto eluido. Este sistema de detección consta de varios procesos, siendo el primero de ellos la nebulización del eluyente y la selección de gotas pequeñas. El eluyente de la columna se mezcla con un gas inerte y pasa por un estrecho orificio de un nebulizador para generar una neblina homogénea, compuesta de gotas de fase móvil que contienen el compuesto de interés (omega-3). La tecnología SEDEX LT permite la selección de gotas en función de su tamaño para evitar que las más grandes entren en el tubo de evaporación, ya que las gotas más grandes requieren temperaturas más altas para su secado y son las responsables del incremento de ruido de fondo. El siguiente paso consistiría en la evaporación a baja temperatura. El eluyente nebulizado pasa por un tubo de derivación calefactado para evaporar la fase móvil. Este detector ha sido diseñado para evaporar las fases móviles de alto punto de ebullición a baja temperatura, lo cual minimiza la posible pérdida por descomposición térmica y hace que esta tecnología sea la más fiable en la detección de cualquier compuesto presente en la muestra. Por último, las moléculas de soluto de la niebla, ayudadas por una Focalización Asistida con Gas (GSF) pasan por un cabezal óptico diseñado para medir la intensidad de luz dispersada. GSF con gas (nitrógeno) permite focalizar las partículas sólidas en el cabezal y aumentar la sensibilidad y la seguridad.

Esquema para la **extracción**:



(El proceso que hemos seguido para la extracción es el indicado en el esquema anterior marcado con color azul)

Para la **cromatografía de líquidos**:



**TAREA 4.**

**Descripción teórica de la realización del análisis cuantitativo**

Después de realizar la extracción y el refinado, pasamos a realizar la cromatografía. Hemos obtenido previamente el aceite del pescado el cual contiene el Omega 3 que queremos determinar.

El procedimiento a seguir será el siguiente: Vamos a trabajar con un equipo de HPLC en fase reversa con acetronitrilo y el modificador orgánico mencionado anteriormente. Este proporciona un caudal constante que permite el paso de la fase móvil a través del sistema. Colocamos nuestra muestra en un vial dentro del sistema. Realizamos la inyección, dando lugar al paso del acetronitrilo y la muestra por el interior de la columna cromatográfica, donde se encuentra la fase estacionaria. Al pasar la muestra por la columna, se va a producir un equilibrio de distribución del analito entre la fase móvil y la estacionaria. Los distintos componentes de la misma irán pasando según la afinidad con la fase estacionaria. Posteriormente pasará por un detector de difusión de luz evaporativo, escogido en base a las propiedades físicas del Omega 3. Cuando la muestra ha pasado a través del detector, un fotosensor a 120° de la fuente de luz mide la intensidad de la luz dispersada, obteniendo un valor número que nos sirve para determinar posteriormente la concentración de este ácido graso.

## REFERENCIAS:

Tengku-Rozaina, M., & Birch, E. J. (2013). Enrichment of omega-3 fatty acids of refined hoki oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 90(8), 1111-1119.

Valenzuela, A., Sanhueza, J., & De la Barra, F. (2012). El aceite de pescado: ayer un desecho industrial, hoy un producto de alto valor nutricional. *Revista Chilena de Nutrición*, 39(2), 201-209.

Taylor, L. T. (2009). Supercritical fluid chromatography for the 21st century. *The Journal of Supercritical Fluids*, 47(3), 566-573..

Rubio, N., Diego, S. M., Beltrán, S., Jaime, I., Sanz, M. T., & Rovira, J. (2008). Supercritical fluid extraction of the omega-3 rich oil contained in hake (*Merluccius capensis*/*Merluccius paradoxus*) by-products: study of the influence of process parameters on the extraction yield and oil quality. *The Journal of Supercritical Fluids*, 47(2), 215-226.

Pieck, C. A., Crampon, C., Charton, F., & Badens, E. (2016). A new model for the fractionation of fish oil FAEEs. *The Journal of Supercritical Fluids*, 120, 258-265.

Perretti, G., Motori, A., Bravi, E., Favati, F., Montanari, L., & Fantozzi, P. (2007). Supercritical carbon dioxide fractionation of fish oil fatty acid ethyl esters. *The Journal of Supercritical Fluids*, 40(3), 349-353