Comunicación Breve

Comparación de dos técnicas de extracción de materia grasa para la determinación de residuos organoclorados en alimentos

Por R. Lázaro, S. Bayarri, P. Conchello, A. Ariño y A. Herrera*

Unidad de Higiene, Inspección, Control y Microbiología de los Alimentos.
Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza. c/ Miguel Servet 177. 50013 Zaragoza.

RESUMEN

Comparación de dos técnicas de extracción de materia grasa para la determinación de residuos organoclorados en alimentos.

Se comprueba la eficacia en la extracción de materia grasa por dos técnicas: (a) Soxhlet en caliente automatizado (SOXTEC® System HT) y (b) homogeneización en frío con éter de petróleo según el PAM (Pesticide Analytical Manual, 1994) como fase previa preparativa para el análisis de residuos de compuestos organoclorados en alimentos. Se analizaron por duplicado 19 muestras de alimentos cocinados con un contenido graso aproximado entre 1-20%.

Las dos técnicas de extracción ensayadas no mostraron diferencias significativas ($p > 0,05$) en la determinación del contenido graso realizado por gravimetría, por lo que se eligió la técnica PAM dadas sus ventajas operativas en la recuperación de los residuos de interés. Asimismo, la precisión y repetibilidad de dicha técnica se consideran satisfactorias, tras el análisis por cuadruplicado de cuatro tipos de muestras.

PALABRAS-CLAVE: Alimento — Comparación de métodos — Materia grasa (extracción) — Residuo organoclorado.

SUMMARY

Comparison between two techniques of fat extraction in foods prior to the determination of chlorinated residues.

The efficiency of two methods for extracting the fat content of foods prior to determining the chlorinated residues were compared: (a) automated Soxhlet at high temperature (SOXTEC® System HT) and (b) homogenization with petroleum ether at room temperature by the PAM technique (Pesticide Analytical Manual, 1994). Both techniques were tested on 19 different ready-to-eat foods, covering a range of fat contents between 1 and 20%.

There were no significant differences ($p > 0.05$) between the two techniques in the fat contents determined gravimetrically. Thus, the PAM technique was selected given its better performance for residue analysis. Furthermore, four samples of different food commodities were analyzed 4-times each using the PAM technique and results indicated a good accuracy and repeatability.

KEY-WORDS: Chlorinated residue — Comparison of methods — Fat content (extraction) — Food.

1. INTRODUCCION

El procedimiento general de análisis de multiresiduos organoclorados (pesticidas, PCBs...) en muestras de alimentos puede resumirse en una fase de extracción que permite la separación de los analitos de los componentes mayoritarios, una fase de purificación que elimina los componentes interferentes, y un análisis instrumental para la

separación, identificación y cuantificación de los residuos, y finalmente una confirmación de éstos (Stan, 1990).

La mayoría de los autores consideran las dos primeras etapas como las más críticas del análisis, ya que de ellas depende el conseguir las fracciones adecuadas para el análisis posterior, que preferentemente se realiza mediante cromatografía gas-líquido con detector de captura electrónica (GLC-ECD).

En las matrices alimentarias ricas en grasa, la extracción completa de los residuos lipofílicos, como es el caso de los pesticidas organoclorados y PCBs, sólo se asegura cuando se extrae toda la grasa de la muestra, por lo que la elección del método más adecuado está condicionada por el tipo de muestra y los analitos a investigar. En general las técnicas comunes se basan en una extracción de la muestra, deshidratada previamente con sulfato de sodio anhidro, mediante maceración o elución en columna con un solvente orgánico o mezclas de solventes, o bien mediante la técnica de extracción Soxhlet clásica o automatizada (SOXTEC® System HT).

Aunque la técnica Soxhlet tiene la ventaja de realizar una extracción en continuo durante varias horas sin requerir la atención que merecen las otras técnicas citadas, presenta el inconveniente de posible contaminación de la muestra a partir de los cartuchos utilizados, los cuales deben someterse previamente a una extracción exhaustiva (Telling, 1977; Lafleur y Pangaro, 1981). Además, la técnica Soxhlet ha sido criticada por su eficacia en la extracción de pesticidas ya que no extrae toda la fracción fosfolipídica (Atkinson *et al.*, 1972). Los pesticidas correlacionados positivamente con esta fracción son aldrín y diel-drín en grasa de cerdo (Yadrick *et al.*, 1972) y lindano, diel-drín y DDT en huevos (Zabik y Dugan, 1971). No obstante, dicha técnica es muy utilizada como fase de extracción en el análisis de residuos organoclorados (Tanabe *et al.*, 1991; Kannan *et al.*, 1992; Himberg, 1993); asimismo el sistema automatizado SOXTEC® ha sido recientemente utilizado en la fase previa preparatoria al análisis de contaminantes medioambientales (Sturaro *et al.*, 1993).

Por otra parte, en la determinación de residuos de compuestos organoclorados y con el fin de evaluar la ingesta de este tipo de contaminantes con la dieta, hay que destacar la importancia que tiene el expresar los resultados

como concentración absoluta en peso de producto o peso de grasa extraída, máxime cuando la legislación expresa los límites máximos de residuos en alimentos de origen animal en ppm base grasa (mg/kg de grasa) (RD 569/1990, BOE de 9 de mayo de 1990). De hecho, el análisis de los resultados obtenidos en función del contenido lipídico del producto no permite afirmar que los productos más grasos estén más contaminados; considerando el producto íntegro tal como se consume, los productos con más grasa son los que mayor ingesta de pesticidas aportan, sin embargo esto no debe interpretarse como que la grasa esté más contaminada, sino que el efecto se debe a la mayor cantidad de grasa que poseen, no a que la misma presente mayor concentración de pesticidas.

El objetivo de este trabajo ha sido comprobar la eficacia de dos técnicas de extracción de lípidos en la fase preparatoria para el análisis de residuos de compuestos organoclorados: (a) Soxhlet automatizado mediante el sistema SOXTEC® System HT y (b) maceración-homogeneización con un solvente orgánico, con la finalidad de disponer de una técnica que permita simultáneamente una recuperación eficiente de dichos residuos y una determinación fiable del contenido de materia grasa de la muestra.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Preparación de las muestras

El estudio se realizó sobre 19 matrices alimentarias pertenecientes a diversos grupos de alimentos que constituyen parte de la dieta media y en las que se estimó un contenido en lípidos variable, entre 1-20%. Las muestras consistieron en raciones individuales de preparaciones culinarias recogidas en comedores colectivos, acondicionadas en envases adecuados y congeladas a -23°C hasta su análisis. Tras su descongelación (24 horas a temperatura de refrigeración) y eliminadas las partes no comestibles se procedió de la forma siguiente:

Cada muestra se homogeneizó mediante una picadora Moulinex (Modelo R 68) antes de tomar dos alícuotas, una de 2,5 g para la extracción mediante SOXTEC® y otra de 25-50 g para la extracción mediante la técnica del PAM; en ambos casos la extracción, que se hizo con éter de petróleo (Anónimo, 1985; PAM, 1994), se realizó por duplicado con el fin de asegurar la representatividad de los resultados.

2.2. Técnicas de determinación del contenido graso

a) Para la extracción por la técnica Soxhlet automatizada, la muestra se sometió a una hidrólisis previa por ebullición suave durante una hora con 100 mL de HCl 3N. Se procedió a enfriar y filtrar sobre un papel de filtro (S&S Ref.-No. 300312) evitando cualquier paso de materia grasa al filtrado. El residuo se lavó con agua fría hasta la desaparición de la reacción ácida, lo que se comprobó con papel indicador (Papel indicador universal de pH INDE-SA). Posteriormente se desecaron los papeles de filtro

dentro del cartucho de extracción en estufa de desecación a $96\pm 2^\circ\text{C}$ durante 90 minutos. La extracción de la materia grasa se realizó con un equipo SOXTEC® System HT según las especificaciones técnicas del aparato. Dicho equipo automatiza la técnica Soxhlet reduciendo el coste, el tiempo de extracción y mejorando la repetibilidad de la técnica Soxhlet clásica (Lutonska, 1986).

b) Para la extracción por maceración, las alícuotas de 25-50 g mezcladas con 100 g de sulfato de sodio anhidro se procesaron de acuerdo con la técnica propuesta en el PAM (1994) mediante homogeneización durante dos minutos en Ultra-Turrax T 25 con 150 mL de éter de petróleo; el extracto orgánico se filtró sobre doble papel de filtro (Whatman nº 4) en embudo Buchner de 12 cm de diámetro y con la ayuda de vacío; el mismo proceso se repite dos veces más con 100 mL de éter de petróleo y finalmente se lava el vaso de homogeneización tres veces con 25-50 mL del mismo disolvente.

El extracto orgánico reunido se pasa a través de una columna de 25x50 mm de sulfato de sodio anhidro (≈ 30 gramos) y el eluato es concentrado en rotavapor hasta eliminación de todo el disolvente y se deja enfriar en desecador a temperatura ambiente.

En ambos casos la determinación del contenido de lípidos en cada muestra se realizó por gravimetría con una aproximación de 1 mg, mediante una balanza analítica Sartorius A 200 S calibrada por el Servicio de la Calidad y Seguridad Industrial de la Diputación General de Aragón.

3. RESULTADOS Y DISCUSION

La tabla I indica el contenido lipídico obtenido para cada matriz con las dos técnicas de extracción ensayadas, expresado como gramos de grasa en 100 gramos de porción comestible.

Con el fin de comprobar que no existen diferencias significativas en los porcentajes de lípidos obtenidos con las dos técnicas se realizó un estudio estadístico basado en el test de t-Student para muestras apareadas ($\alpha=0,05$) (Sachs, 1978).

De los resultados obtenidos tras el correspondiente estudio estadístico podemos concluir que las dos técnicas de extracción ensayadas no presentan diferencias significativas en cuanto a la determinación del contenido de materia grasa en alimentos.

Otros autores (Telling et al., 1977) no han encontrado diferencias en el contenido de grasa de diferentes productos cárnicos, obtenido bien por extracción Soxhlet con hexano o con una mezcla de cloroformo:metanol, bien mediante maceración directa con una mezcla de hexano:acetona (4:1), aplicando finalmente esta última técnica extractiva a diferentes grupos de alimentos (carne, pescado, huevos, pollo) como fase preparatoria para el análisis de residuos organoclorados.

Asimismo García-Regueiro *et al.* (1987) evaluaron ambas técnicas en muestras de carne y productos cárnicos: una extracción cíclica en Soxhlet con una mezcla hexano:cloruro de metileno (1:1) y homogeneización con

Tabla I
Valores medios de contenido de grasa obtenidos del análisis por duplicado
de diversas preparaciones culinarias mediante las técnicas SOXTEC® y PAM.
Resultados expresados como gramos de grasa en 100 gramos de porción comestible

Muestra	SOXTEC® (x)	PAM (y)	x-y
Judías blancas guisadas con tocino	2,22	1,84	0,38
Espaguetis	1,70	1,36	0,34
Lomo de cerdo empanado	17,17	16,70	0,47
Pastel de carne	8,18	7,43	0,75
Estofado de ternera	14,70	15,62	-0,92
Lenguado frito	14,19	13,30	0,89
Trucha en salsa	6,06	7,01	-0,95
Escalope de ternera	15,25	13,44	1,81
Merluza en salsa verde	9,47	8,42	1,05
Bonito en salsa	6,09	6,40	-0,31
Pollo asado	20,28	21,71	-1,43
Lentejas guisadas	7,22	8,12	-0,90
Arroz blanco con huevo frito	1,52	1,60	-0,08
Trucha en salsa	2,53	3,63	-1,10
Judías blancas guisadas con chorizo	2,53	1,82	0,71
Pez limón en salsa	4,69	3,91	0,78
Estofado de carne	7,39	6,32	1,07
Pollo asado	18,68	17,57	1,11
Huevos cocidos con mayonesa	19,95	18,67	1,28
Valor medio	9,46	9,20	0,26
Test t-Student (muestras apareadas)		p>0,05	

acetónitrilo; si bien las dos técnicas de extracción no presentaron diferencias importantes en cuanto a la recuperación de los plaguicidas ensayados, los autores destacan la conveniencia de aplicar la extracción con acetónitrilo debido a que ello simplifica la técnica de purificación posterior.

En nuestro caso, el hecho de que hayamos utilizado en ambos sistemas el mismo solvente nos permite comparar aún mejor el método. En base a nuestros resultados, se puede concluir que la elección del método de extracción basado en una homogeneización en frío con solventes

orgánicos como fase preparatoria del análisis de residuos organoclorados en alimentos, radica en la buena eficacia de la extracción de los residuos liposolubles con dicha técnica, como lo demuestra su recomendación como método oficial en este tipo de análisis (PAM, 1994).

Con el fin de estudiar la repetibilidad de la técnica de extracción recomendada por el PAM (1994) en la determinación del contenido de materia grasa, se analizaron cuatro muestras diferentes por cuadruplicado. El estudio estadístico de los resultados obtenidos muestran una buena repetibilidad de la técnica ensayada (tabla II).

Tabla II
Evaluación de la repetibilidad en la determinación de grasa
con la técnica de extracción recomendada en el PAM (1994).
El porcentaje de grasa (g de grasa en 100 gramos de porción comestible)
representa el valor medio de cuatro determinaciones

Muestra	Porcentaje de grasa	s	s ²	100 s/x
Judías blancas	1,87	0,0450	0,0020	2,41
Pastel de carne	7,49	0,2081	0,0433	2,78
Pollo asado	17,57	1,4522	2,1088	8,27
Huevos cocidos con mayonesa	18,74	0,4890	0,2391	2,61

s: desviación standard; s²: varianza; 100 s/x: coeficiente de variación.

Considerando que no existen diferencias significativas entre las dos técnicas ensayadas en cuanto a la proporción de lípidos extraídos, y que la técnica recomendada por el PAM permite una recuperación eficiente de los residuos de plaguicidas clorados, se reafirma la elección de dicha técnica que logra simultanear ambas exigencias y presenta una aceptable precisión y repetibilidad.

AGRADECIMIENTO

El presente trabajo ha sido realizado gracias a la concesión del Proyecto CICYT ALI 92-0765. Los autores agradecen al Técnico Especialista D. Angel Barceló la asistencia técnica en el manejo del equipo SOXTEC® System HT.

BIBLIOGRAFIA

- Anónimo. (1985).- "Análisis de alimentos".- Métodos oficiales recomendados por el centro de Investigación y Control de la Calidad. Ministerio de Sanidad y Consumo. Madrid.
- Atkinson, S.S., Fowler, V.R., Garton, G.A. y Lough, A.K. (1972).- "A rapid method for the accurate determination of lipid in animal tissues".- *Analyst* **97**, 562.
- García-Regueiro, J.A., Díaz, I. y Monfort, J.M. (1987).- "Determinación de plaguicidas organoclorados, mediante cromatografía de gases con columna capilar (CGC), en carne y productos cárnicos del mercado de Gerona".- *Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment.* **27**, 405-416.
- Himberg, K., Hallikainen, A. y Louekari, K. (1993).- "Intake of polychlorinated biphenyls (PCB) from the Finnish diet".- *Z. Lebensm. unters. Forsch.* **196**, 126-130.
- Kannan, K., Tanabe, S., Ramesh, A., Subramanian, A. y Tatsukawa, R. (1992).- "Persistent organochlorine residues in foodstuffs from India and their implications on human dietary exposure".- *J. Agric. Food Chem.* **40**, 518-524.
- Lafleur, A.L. y Pangaro, N. (1981).- *Anal. Lett.* **14**, 1613.- [Citado por Sherma, J. y Zweig, G. (1983).- "Pesticides".- *Anal. Chem.* **55**, 57R].
- Lutonska, P. (1986).- "The determination of crude fat in feed using the SOXTEC System HT".- *In Focus (The Tecator journal of technology for chemical analysis)* **9**(2) 6-7.
- PAM. (1994).- "Pesticide Analytical Manual, Vol. I: Multiresidue methods".- 3rd Ed.-Food and Drug Administration, Department of Health & Human Services, Rockville (Maryland).
- Sachs, L. (1978).- "Estadística aplicada".- 1.ª Ed.- Labor, Barcelona.
- Stan, H.J. (1990).- "Pesticides" en "Principles and applications of gas chromatography in food analysis".- M.H. Gordon (Ed.).- Ellis Horwood, New York.
- Sturaro, A., Parvoli, G., y Doretti, L. (1993).- "The Soxtec® system in gas chromatographic/mass spectrometric analysis of environmental organic compounds".- *In Focus (The Tecator journal of technology for chemical analysis)* **17**(2) 14-16.
- Tanabe, S., Kannan, K., Tabucanon, M. S., Siriwong, C., Ambe, Y. y Tatsukawa, R. (1991).- "Organochlorine pesticide and polychlorinated biphenyl residues in foodstuffs from Bangkok, Thailand".- *Environmental Pollution* **72**, 191-203.
- Telling, G.M., Sissons, D.J. y Brinkman, H.W. (1977).- "Determination of organochlorine insecticide residue in fatty foodstuffs using a clean-up technique based on a single column of activated alumina".- *J. Chromatography* **137**, 405.
- Yadrick, M.K., Zabik, M.E. y Funk, K. (1972).- "Dieldrin levels in relation to total, neutral and phospholipid composition in selected pork muscles".- *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **8** (5) 289-293.
- Zabik, M. E. y Dugan, L. R. (1971).- "Location of lindane, dieldrin and DDT Compounds in Eggs".- *J. Agr. Food Chem.* **19**, 904.

Recibido: Septiembre 1994

Aceptado: Enero 1995