



Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco
Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud
Departamento de Química

TRABAJO FINAL DE LICENCIATURA EN QUÍMICA

“Extracción, cuantificación y análisis de lípidos en la
almeja comestible *Ameghinomya antiqua*
del Golfo San Jorge”

Alumno: Camilo Andrés Becerra Cruz

Directora: Dra. Cecilia Alejandra Crovetto

Colaboradora: Bioq. Vanesa Álvarez

2023

DEDICATORIA

A mis padres: Patricia Cruz y Andres Becerra, por todo el apoyo brindado en este proceso de crecimiento y por todo el trabajo que realizaron para que esto sea posible.

A mi hermano: Tomas Becerra, por su constante soporte en los momentos de vértigo.

A mi familia: Leonardo Becerra y Maria Fernanda Ferrero, ustedes me brindan la motivación para seguir adelante.

Gracias a la educación pública pude finalizar mis estudios universitarios.

AGRADECIMIENTOS

A mi Directora la Dra. Cecilia Crovetto por todo el soporte y enseñanzas que me brindó durante la realización de esta Tesis.

A la bioquímica Vanesa Álvarez por toda la energía, compañía y soporte en la realización de la Tesis.

A mis compañeros de Universidad, con los cuales pase muchos momentos gratos e inolvidables en los pasillos de la UNPSJB.

A Dr. Martin Varisco por facilitar las muestras

A Dra. Graciela Pucci por su colaboración con la cromatografía gaseosa

Al equipo del Dr. Héctor Álvarez y Dra. Roxana Silva por su asesoramiento y colaboración

Al cuerpo Docente de la Carrera Licenciatura en Química, gracias a todos los que compartieron su conocimiento y participaron en mi formación como profesional.

A todo el equipo de trabajo de Tratamientos Químicos de PECOM por facilitar los permisos necesarios para avanzar con mis estudios.

ÍNDICE

1. RESUMEN	7
2. INTRODUCCIÓN	8
3. OBJETIVOS	14
3.1. OBJETIVO GENERAL	14
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
4. MATERIALES Y MÉTODOS	15
4.1. MATERIALES y REACTIVOS	15
4.2. OBTENCIÓN DE LA MUESTRA	17
4.3. DETERMINACIÓN DE LÍPIDOS TOTALES	17
4.4. ANÁLISIS DE LÍPIDOS POR TLC	19
4.5. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE ÁCIDOS GRASOS	20
4.6. DETERMINACIÓN DEL COLESTEROL	22
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
5.1. MORFOLOGÍA DE LAS ALMEJAS	23
5.2. DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE LÍPIDOS	25
5.3. ANÁLISIS DE LÍPIDOS POR TLC	26
5.4. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE ÁCIDOS GRASOS	29
5.5. CUANTIFICACIÓN DE COLESTEROL	34
6. CONCLUSIÓN	35
7. BIBLIOGRAFÍA	36

ABREVIATURAS

Ácidos grasos saturados (AGS)

Ácidos grasos monoinsaturados (AGMI)

Ácidos grasos poliinsaturados (AGPI ó PUFAs)

Ácidos grasos omega-3 (ω 3)

Ácidos grasos omega-6 (ω 6)

Ácido eicosapentaenoico (EPA)

Ácido docosahexaenoico (DHA)

Adenosín trifosfato (ATP)

Factor de retención (Rf)

Thin layer chromatography (TLC)

Triacilglicérido (TAG)

1. RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue realizar la extracción, cuantificación y análisis de lípidos en la almeja comestible *Ameghinomya antiqua* recolectada en Caleta Córdova, ubicada en el Golfo San Jorge, Argentina. El trabajo se llevó a cabo en la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, en el marco del trabajo final de la Licenciatura en Química. Se determinó que los lípidos constituyen el 0,50 (\pm 0,08) mg% del peso de la almeja. Mediante cromatografía se identificó la presencia de fosfolípidos, triacilglicéridos, ácidos grasos y colesterol. Se encontró una amplia variedad de ácidos grasos como los saturados palmítico (16:0) y esteárico y entre los ácidos grasos insaturados el oleico (18:1n9), linoleico (18:2n6), ácidos grasos ω 3 como C20:5n3 (EPA) y C22:6n3 (DHA) y ω 6 como ácido araquidónico (C20:4n6). La relación ω 3/ ω 6 fue 1,82. La concentración de colesterol fue de 75,2 (\pm 0,118) mg/100g de carne. Se concluye que la carne de la almeja *Ameghinomya antiqua* es magra y es una fuente rica de ácidos grasos esenciales lo que sugiere su posible valor en la alimentación.

2. INTRODUCCIÓN

La almeja *Ameghinomya antiqua* (Fig. 1) es una especie de molusco bivalvo comestible que habita en las costas de Argentina desde la Provincia de Buenos Aires hasta Tierra del Fuego. Debido a su sabor y propiedades nutricionales, es muy valorada en el mercado y es una de las especies de bivalvos más explotadas en Chile y la Argentina. En Patagonia, *A. antiqua* se encuentra en fondos arenosos, desde el submareal somero hasta los 150 m de profundidad y es aprovechada mediante marisqueo por buceo o durante la bajamar. Sin embargo, a pesar de su importancia económica y cultural, es escasa la información en lo que respecta a su composición química, particularmente en lo que se refiere a los lípidos y ácidos grasos que contiene.



Figura 1: almeja comestible *Ameghinomya antiqua*

Los lípidos son un componente esencial en la alimentación humana, ya que son una fuente importante de energía y contienen ácidos grasos esenciales (Valenzuela et al., 2002). Los mariscos son una fuente importante de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), particularmente de omega-3, como el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el docosahexaenoico (DHA) (Bedregal y Mollinedo, 2022). Estos ácidos grasos son esenciales para el organismo humano y desempeñan un papel crucial en la salud, incluyendo beneficios para el sistema cardiovascular, disminuyendo el colesterol total, en el desarrollo cerebral y la función cognitiva (Valenzuela et al., 2011).

Por lo tanto, es importante investigar la cantidad y composición de los lípidos presentes en la almeja *Ameghinomya antiqua*, especialmente en las poblaciones que habitan en el Golfo San Jorge, donde no se ha realizado ningún estudio previo.

Los lípidos son un grupo heterogéneo de moléculas orgánicas que se caracterizan por su insolubilidad en agua y solubilidad en solventes orgánicos como el cloroformo, el éter y el alcohol. En general, están compuestos por una o más moléculas de ácidos grasos, los cuales son cadenas de hidrocarburos con un grupo carboxilo en el extremo, que se unen a una molécula de glicerol o esfingosina para formar los principales tipos de lípidos (Nelson y Cox, 2017).

Se pueden clasificar en 2 categorías principales: los saponificables son aquellos que contienen ácidos grasos en su estructura y pueden ser hidrolizados por una base fuerte, y los lípidos no saponificables que son aquellos que no contienen ácidos grasos en su estructura y no pueden ser hidrolizados por una base fuerte.

Como se observa en la Figura 2, dentro de los saponificables se encuentran los simples como las ceras y triacilglicéridos (grasas y aceites según su punto de fusión y consistencia), principal fuente de ácidos grasos y los complejos, dentro de los cuales se encuentran los fosfolípidos. Dentro de los no saponificables, que presentan insolubilidad en agua, pero no poseen ácidos grasos, se encuentran los esteroides como el colesterol, entre otros.

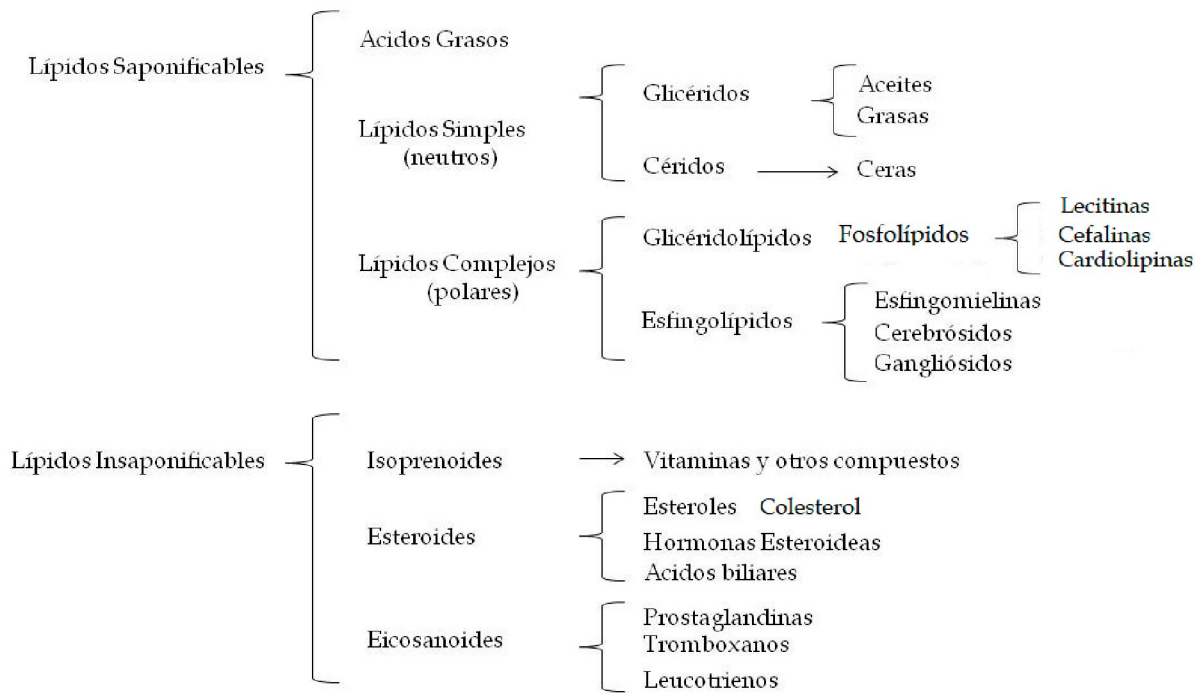


Figura 2: Clasificación general de lípidos. Tomado de <https://www.iidenut.org/instituto/2018/10/16/clasificacion-actualizada-de-los-lipidos/>

Los ácidos grasos son los componentes básicos de los lípidos y pueden ser saturados o insaturados, según la presencia o ausencia de dobles enlaces en su estructura (Fig.3).

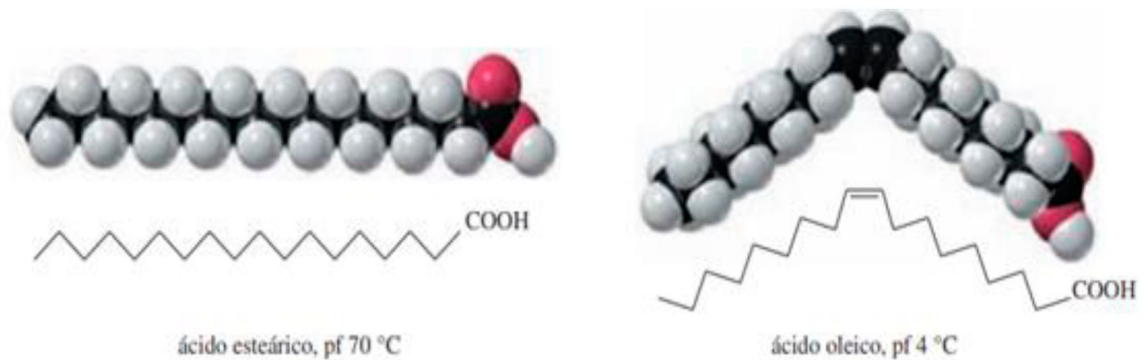


Figura 3: Estructura de Ácidos grasos (Feduchi et al., 2021).

- Los triacilgliceroles (Fig. 4) son lípidos energéticos que se almacenan en el tejido adiposo y se utilizan como fuente de energía en momentos de escasez.

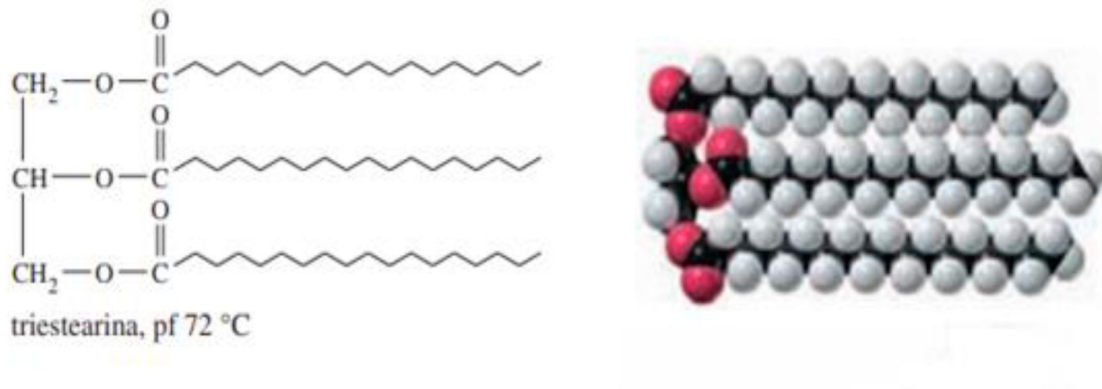


Figura 4: Estructura química de un Triacilglicérido (Feduchi et al., 2021).

- Los fosfolípidos (Fig. 5) son lípidos estructurales que forman parte de las membranas celulares y contienen un grupo fosfato en su estructura.

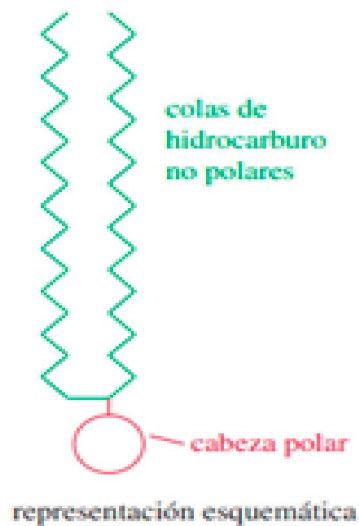


Figura 5: Estructura química de un Fosfolípido (Feduchi et al., 2021)

- Los esteroides, como se observa en la Fig. 6, son moléculas derivadas del núcleo esteroideo CPPHF (ciclopentanoperhidrofenantreno), cuyas estructuras derivan del anillo y cumplen funciones estructurales y de señalización celular.

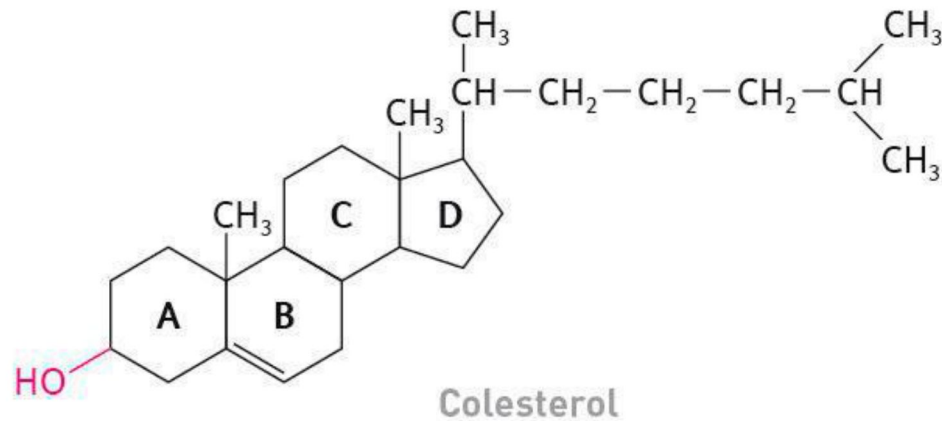


Figura 6: Estructura química del colesterol (Feduchi et al., 2021)

La función de los lípidos es variada y se relaciona con su estructura química y su ubicación en el cuerpo (Nelson y Cox, 2017).

- Son importantes fuentes de energía almacenada en el tejido adiposo, y se utilizan en el metabolismo celular para producir ATP.
- Poseen una función estructural, ya que, forman las membranas celulares y son esenciales para el mantenimiento de la integridad de las células.
- Además, desempeñan un papel importante en la regulación del metabolismo y la señalización celular, y se utilizan para la síntesis de hormonas y otros compuestos bioactivos.

Planteamiento del problema:

Para la gastronomía, los crustáceos más comunes son el camarón, la langosta, el cangrejo y el langostino, entre otros; mientras que los moluscos más comunes son las almejas, los mejillones, las ostras y las vieiras, que tienen caparazón, y los calamares y pulpos, que no lo poseen.

Ameghinomya antiqua (sinónimo de *Venus antiqua*) es una especie de molusco bivalvo (Fig. 6), conocida con el nombre vulgar de almeja comestible, que se encuentra distribuida a lo largo de las costas del sur del Pacífico-Atlántico de América del Sur.

En la región del Golfo San Jorge, Argentina, la almeja comestible es una especie cuyo aprovechamiento para alimentación humana se ha incrementado significativamente en los últimos años, sin embargo, actualmente no hay información disponible sobre su composición química, en particular sobre la cantidad y tipo de lípidos y ácidos grasos presentes en su carne. Esto representa una limitación importante para su aprovechamiento óptimo en la alimentación humana y en otros posibles usos industriales y artesanales. Por lo tanto, es necesario realizar un estudio detallado sobre la composición de lípidos y ácidos grasos de la almeja en la región del Golfo San Jorge, para contribuir al conocimiento científico sobre esta especie y su posible aprovechamiento en diferentes sectores productivos.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Realizar la extracción, cuantificación y análisis de lípidos en la almeja comestible *Ameghinomya antiqua* recolectada en Caleta Córdova, con el fin de contribuir al conocimiento de su composición química y su posible valor en la alimentación humana.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Adquirir destreza en la manipulación de material y en la obtención de la muestra de almejas.
- Cuantificar el contenido de lípidos totales presentes en las muestras de almejas.
- Analizar la fracción lipídica de las muestras de almejas y determinar la presencia de diferentes tipos de lípidos.
- Determinar el contenido de ácidos grasos (AG), tanto saturados (AGS) como insaturados (AGI), monoinsaturados (AGMI) y poliinsaturados (AGPI), en las muestras de almejas.
- Cuantificar colesterol total en carne cruda de almejas

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. MATERIALES y REACTIVOS

Materia Prima de estudio: Almejas; recolectadas en Caleta Córdova

Materiales:

- Poter 100 mL
- Pie Universal
- Pipetas graduadas: 2, 5 y 10 mL
- Pipetas volumétricas de doble aforo: 2 y 5 mL
- Vasos precipitados: 10, 50 y 100 mL
- Propipetas automáticas: 10 y 20 mL
- Micropipetas: (0-10 uL, 10-100 uL y 100-1000 uL)
- Portaobjetos
- Tubos plásticos de 50 mL
- Tubos de ensayo
- Tubos de Kahn
- Gradilla
- Tubos Eppendorf
- Vidrio Reloj y Cápsulas de Petri

Reactivos:

- Colestat Enzimático AA Líquido (Wiener)
- Hidróxido de Sodio, Biopack
- Iodo (I₂) sublimated for analysis EMSURE®
- Cloroformo Pro-análisis (A.C.S), Cicarelli
- Alcohol Iso-Propílico Pro-análisis (A.C.S), Cicarelli
- Metanol grado H.P.L.C, Sintorgan
- n-Hexano para Análisis A.C.S, Sintorgan
- Gel de sílice high-purity grade

- Se utilizaron como testigos de ácidos grasos para la cromatografía en capa fina: extractos de sesos de cordero, yema de huevo y aceite de oliva.

Instrumental:

- Taladro 650 W marca Bosh
- Procesadora de Alimentos 800 W Moulimex
- Calibre digital HDCP 16150 iNCCO
- Centrífuga Rolco
- Centrífuga Rotina 38R
- Espectrofotómetro Spectrum
- Lámpara UV Hach
- Cromatógrafo HP 6890 series II GC
- Cromatógrafo GC HP 5890
- Vortex CK-Tech
- Calibre
- Baño Termostático Modelo Masson
- Balanza Analítica BOECO BAS 31 Plus

4.2. OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

La toma de muestras de las almejas se realizó mediante buceo en fondos arenosos someros en las costas de Caleta Córdova. Las muestras fueron tomadas en agosto y octubre de 2022 y fueron almacenadas en hielo y transportadas al laboratorio para su posterior análisis.

4.3. DETERMINACIÓN DE LÍPIDOS TOTALES

Para cuantificar el contenido de lípidos presentes en la almeja *Ameghinomya antiqua*, se utilizó el método gravimétrico descrito por Bligh and Dyer en 1959. Este método se basa en la extracción de la fracción lipídica utilizando una mezcla de cloroformo y metanol, seguida de la determinación del peso del material lipídico extraído.

El proceso de extracción se llevó a cabo mediante la adición de una mezcla de cloroformo-metanol y agua (65:25:4) a la muestra de almejas previamente trituradas.

Con el fin de triturar y homogeneizar el tejido para la posterior extracción de lípidos, se colocaron 2 g de carne refrigerada de almeja (Fig. 7) en un poter de vidrio. Se adicionaron: 5 mL de metanol, 2,5 mL de cloroformo y 2 mL de agua destilada. Posteriormente se utilizó un taladro para realizar la trituración durante 30 segundos a gran velocidad (Fig. 8).



Figura 7: Carne cruda de almeja



Fig. 8. Obtención del homogeneizado de carne cruda de almeja

Posteriormente, se agregaron 2,5 mL de cloroformo, se agitó otros 30 segundos y finalmente se adicionaron 2,5 mL de agua, agitando 30 segundos más. A continuación, se centrifugó el homogeneizado en un tubo Falcon plástico de 50 mL durante 10 minutos. Posteriormente, se tomó la fase clorofórmica con una micropipeta de 1000 μ L y se llenaron unos tubos eppendorf los cuales previamente fueron pesados en la balanza analítica. Posteriormente, los eppendorf se colocaron bajo campana hasta la evaporación total del cloroformo (Fig. 9).

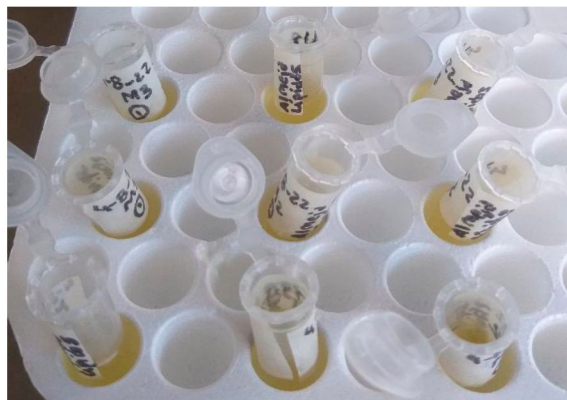


Figura 9: Extracción de lípidos a partir del homogeneizado de almejas

Finalmente, se determinó el peso (%) de la fracción lipídica mediante la diferencia de peso obtenida en los eppendorf.

Este método de extracción de lípidos es ampliamente utilizado debido a su eficacia y precisión y es considerado una técnica de referencia para la cuantificación de lípidos.

$$\text{Contenido de lípidos (\%)} = \frac{\text{peso de lípidos extraídos (g)}}{\text{peso de muestra original (g)}} \times 100$$

4.4. ANALISIS DE LIPIDOS POR TLC

La cromatografía en capa fina TLC (por sus siglas en inglés Thin Layer Chromatography) es un método de afinidad que se utiliza para separar los compuestos de una mezcla, es un método de separación muy versátil que se utiliza ampliamente para el análisis cualitativo y cuantitativo de las muestras. Esta técnica puede utilizarse para analizar prácticamente cualquier clase de sustancia: plaguicidas, esteroides, alcaloides, lípidos, nucleótidos, glucósidos, carbohidratos y ácidos grasos.

En la TLC, la fase estacionaria es una fina capa de material adsorbente, normalmente gel de sílice u óxido de aluminio, que recubre una superficie de placa inerte, normalmente vidrio, plástico o aluminio. Se deposita una pequeña cantidad de la muestra en un extremo de la placa, que luego se coloca verticalmente en una cámara cerrada con un disolvente orgánico (fase móvil). La fase móvil se desplaza de forma ascendente por la placa por capilaridad y los componentes de la muestra migran distancias variables en función de sus afinidades diferenciales por las fases estacionaria y móvil. Cuando el disolvente llega a la parte superior de la placa, ésta se retira de la cámara de desarrollo y se seca. Los componentes separados aparecen como puntos en la placa, y se evalúa el factor de retención (Rf) de cada componente.

El factor de retención (Rf) se utiliza para medir el movimiento de los compuestos a lo largo de la placa de TLC y se define como la distancia recorrida por un componente dividido por la distancia total recorrida por el disolvente. Su valor se encuentra siempre entre cero y uno.

$$Rf = \text{distancia recorrida por el componente} / \text{distancia recorrida por el disolvente}$$

En general, cuanto más fuerte se une un compuesto a la fase estacionaria adsorbente, más despacio migra hacia arriba en la placa de la TLC. Como los adsorbentes de la placa son normalmente polares, los compuestos no polares tienden a subir más deprisa por la placa, lo que produce mayores valores de R_f , mientras que los compuestos polares tienden a moverse más despacio y tienen menores valores de R_f .

Para el análisis de la composición de lípidos, se empleó la técnica de cromatografía en capa fina. En primer lugar, se disolvieron con cloroformo los lípidos obtenidos anteriormente. Luego, se utilizaron cromatofolios de aluminio recubiertos con una capa de sílica gel G60 F₂₅₄ de 6 cm x 9 cm y un espesor de 0,25 mm. Se sembraron 2 uL de la muestra y 2 uL de cada testigo utilizando una micropipeta de 0 a 10 uL. Posteriormente, se dejó secar la placa y se colocó en un recipiente con una solución de eluyente adecuada.

El sistema de solventes utilizado para la corrida en TLC fue una mezcla de Cloroformo:Metanol:Agua (65:25:4) para fosfolípidos (Tamargo-Santos et al., 2011) y el sistema Hexano:Éter Etílico:Ácido Acético (80:20:1) para lípidos neutros (Deranieh et al., 2013). Estos sistemas son comúnmente utilizados en la separación de lípidos y permiten una buena separación y visualización de los componentes de la muestra. Como testigos se utilizaron lípidos de muestras de sesos de vaca y de yema de huevo.

Finalmente, para visualizar los lípidos y revelar, la placa se colocó durante 5 minutos en el interior de la cuba con cristales de yodo. El yodo reacciona con los lípidos en la placa, generando manchas marrones oscuras que permiten visualizar la separación de los diferentes componentes de la muestra e identificarlos por comparación con patrones de referencia (Deranieh et al., 2013; Tamargo-Santos et al., 2011).

4.5. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE ÁCIDOS GRASOS

La cromatografía gaseosa capilar (CG) es una técnica analítica que permite separar y cuantificar componentes volátiles de una muestra. Se trata de una técnica de reparto líquido-gas, que se realiza en una columna rellena de un sólido finamente dividido, que actúa como soporte. La fase estacionaria (líquido) forma un líquido no volátil que impregna el soporte, y la fase móvil, un gas inerte que fluye por la columna a velocidad constante.

La muestra, que debe ser volátil, se disuelve en un solvente orgánico adecuado, los más utilizados son acetona, hexano y acetato de etilo. Se introduce con una microjeringa en un bloque con una temperatura elevada. Se produce la evaporación de los componentes de la mezcla, que son arrastrados por el flujo del gas. Los productos volátiles se separan en la columna según su reparto, entre la fase líquida estacionaria y la fase gaseosa móvil.

Los productos separados, a su paso por la columna se detectan a la salida con sistemas de detección apropiados. La señal se comunica a un registro que lleva acoplado un integrador para las medidas del área de los picos correspondientes a cada una de las sustancias separadas.

El tiempo de retención de cada compuesto se utiliza en la cromatografía de gases para la identificación de las sustancias. El tiempo de retención aumenta en forma exponencial con el número de átomos de carbono en una serie homóloga de compuestos. La representación del logaritmo del tiempo de retención, frente al número de átomos de una serie homóloga de compuestos, da una línea recta. El área de cada pico se utiliza para los análisis cuantitativos (González de Buitrago, 1990).

Los compuestos que no son volátiles, se transforman previamente en derivados volátiles. La derivatización de los lípidos mediante metanólisis convierte los ácidos grasos en sus correspondientes metil-ésteres de ácidos grasos (MEAG).

La metanólisis se realizó utilizando una mezcla de partes iguales de cloroformo (CHCl_3) y solución de metanol con ácido sulfúrico ($\text{MeOH}:\text{H}_2\text{SO}_4$ 85:15), a 100°C durante al menos 3 horas. Luego, la fase clorofórmica resultante se inyectó en el cromatógrafo de gases.

Para la caracterización de los ácidos grasos presentes en la muestra se utilizó un estándar externo de metil-ésteres de ácidos grasos comercial. Los datos cuantitativos se calcularon usando el área de pico (% del total de ácidos grasos). Los ácidos grasos se expresaron como porcentaje relativo (Álvarez et al., 1996).

El estudio de lípidos se realizó en una muestra obtenida en el mes de agosto, mediante un cromatógrafo gas-líquido (CGL) de la Dra. Graciela Pucci (CEIMA), en donde los ácidos grasos

fueron determinados como metil esteres por cromatografía gaseosa, usando una columna capilar ultra 2, de 25m de longitud y 0,2 mm de diámetro. El análisis se llevó a cabo con un cromatógrafo HP 6890 series II GC (inyección splitless; presión inicial 10 psi; programa de temperatura: 170-288°C a 28°C/min, 288-310°C 60°C/min, 1,5 min de permanencia a 310°C, detector por ionización de llama. La integración de los picos se realizó mediante el programa HP10.01 Chem Station. Los ácidos grasos fueron identificados utilizando Sherlock (versión 6.0) con el estándar Agilent Calibration standards kit for the microbial identification system. La composición en ácidos grasos fue calculada como porcentaje del área del pico.

Además, gracias a la colaboración del Dr. Héctor Álvarez (INBIOP), se pudo realizar otra cromatografía, en la muestra de octubre. El equipo utilizado fue un GC HP 5890, con una columna capilar Capilar TR-FAME, utilizando H₂ como gas portador. El volumen de inyección fue de 3 µL mediante inyector Split, a 260 °C. El flujo (mL/min) fue de 100 kPa. El detector utilizado fue FID. El programa utilizado fue el siguiente: Temperatura inicial 120 °C, Tiempo inicial 1 min., Tasa de rampa inicial 8 °C/min, Temperatura final 200 °C, Tasa de rampa final 3 °C/min. Tiempo final 1 min.

4.6. DETERMINACIÓN DEL COLESTEROL

El colesterol se determinó espectrofotométricamente según el procedimiento enzimático descrito por Saldanha et al. (2004). A un eppendorf con extracto se le adicionó 0,4 mL de solución acuosa de hidróxido de potasio (KOH) al 50% y 0,6 mL de alcohol etílico (96°). Se colocó en baño de agua a 40 °C hasta disolución completa con la ayuda del vortex y luego se elevó la temperatura manteniéndola a 60 °C por 10 min para su saponificación. Cumplido ese tiempo, se le adicionaron 0,5 mL de agua destilada (AD) y se dejó enfriar. A continuación, se extrajeron los lípidos apolares con 1 mL de hexano y agitación con vortex. Se separó la fase conteniendo hexano y se realizaron 2 extracciones más de 0,5 mL cada una. Se juntaron las extracciones y se tomó 1 mL del extracto hexánico, evaporando el solvente bajo campana. Al residuo se le agregaron 500 µL de isopropanol y se mezcló en vortex hasta disolución completa. Posteriormente, se adiciono 1,5 mL del reactivo compuesto por 4-aminofenazona, fenol, agua destilada y enzimas (97 mL de agua destilada, 0,5 mL de 4-aminofenazona 25 mmol/L, 0,5 mL de fenol 55 mmol/L y 2 mL de enzimas (300 U/mL de lipasa, 3 U/mL colesterol

oxidasa y 20 U/mL de peroxidasa)) (Wiener kit, Wiener lab. S.A.I.C., Rosario, Argentina). Se incubó a 37 °C en baño de agua durante 10 min. Después de la reacción se midió la absorbancia a λ : 505 nm contra blanco de reactivos. El ensayo se realizó por triplicado.

Para calcular la concentración de las muestras se construyó una curva de calibración con concentraciones de colesterol de 0,2; 0,4; 0,8 y 1 mg/mL disueltos en 500 uL de isopropanol. Cada tubo se analizó por triplicado. Se utilizó un estándar de colesterol de Sigma (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Los resultados se expresaron en base húmeda como mg/100g de carne.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. MORFOLOGÍA DE LAS ALMEJAS:

Como muestra la Figura 10, las mediciones se tomaron con un calibre. Las medidas se registraron en centímetros para el largo y ancho, y en gramos para el peso.

En las Tablas 1 y 2 se muestran las medidas de una muestra de 10 almejas (largo, ancho y peso), recolectadas en agosto y octubre en Caleta Córdova.



Figura 10: Medición del largo y ancho de las almejas mediante un calibre.

Tabla 1: Medidas morfométricas y pesos de las almejas recolectadas en el mes de agosto

Almeja	Largo (cm)	Ancho (cm)	Peso (g)
1	59	54	9,49
2	57	51	8,28
3	52	47	6,86
4	57	49	10,16
5	53	50	7,72
6	53	48	8,18
7	53	48	7,96
8	52	47	7,83
9	52	47	8,56
10	49	44	7,63
Promedio	54 ± 3	48 ± 3	8,27 ± 0,95

Tabla 2: Medidas morfométricas correspondientes a las almejas colectadas en el mes de octubre

Almeja	Largo (cm)	Ancho (cm)	Peso (g)
1	57,6	50,0	12,29
2	56,3	49,8	10,38
3	54,5	48,0	12,48
4	52,7	44,9	9,28
5	58,7	53,2	16,03
6	55,8	51,3	12,09
7	55,7	51,0	15,88
8	58,3	52,6	14,72
9	56,6	50,2	11,76
10	50,6	47,3	9,18
Promedio	55,7 ± 2,5	49,8 ± 12,4	12,41 ± 2,48

Los resultados indican que las almejas recolectadas en octubre poseen medidas morfométricas ligeramente mayores que las obtenidas en agosto, tanto en largo como en ancho y peso.

5.2. DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE LÍPIDOS.

Se tomaron muestras de agosto por triplicado. Los pesos de las muestras y el porcentaje de lípidos obtenidos se muestran en las Tablas 3 y 4.

Tabla 3: Determinación del porcentaje de lípidos en carne fresca de almeja obtenida en agosto

Muestra	% Lípidos
M1,1	0,51
M1,2	0,74
M1,3	0,51
M2,1	0,38
M2,2	0,46
M2,3	0,48
M3,1	0,40
M3,2	0,48
M3,3	0,49
Promedio	0,50 ± 0,08

Tabla 4: Determinación del porcentaje de lípidos en carne fresca de almeja obtenida en octubre

Muestra	% Lípidos
M1,1	0,41
M1,2	0,50
M1,3	0,80
M2,1	0,45
M2,2	0,50
M2,3	0,50
M3,1	0,44
M3,2	0,44
M3,3	0,43
Promedio	0,50 ± 0,07

El valor de lípidos totales en la carne cruda de almeja patagónica fue de 0,5 g/100 g de carne. Este valor es menor a los encontrados en especies como: pulpo patagónico (*Enteroctopus megalocyathus*) 1,06 g% (Crovetto et al., 2018), centolla (*Lithodes santolla*) 0,7 g% (Crovetto et al., 2007), langostilla (*Munida gregaria*) 5,25 g% (Crovetto et al., 2007) y mejillón (*Mytilus edulis*) 1,53g% (Colombo et al., 2016) y en peces como el róbalo (*Eleginops maclovinus*) 1,66 g% y en merluza (*Merluccius hubbsi*) 1,82 g% (Crovetto et al., 2009).

5.3. ANÁLISIS DE LÍPIDOS POR TLC

Una vez revelada la placa con los vapores de iodo, se puede determinar el factor de retención (Rf) para cada sustancia o componente. Se observa que los compuestos polares tienden a moverse más despacio y tienen menores valores de Rf (Fig. 10 y 11).

$$R_f = \frac{\text{Distancia de la sustancia}}{\text{Frente de la fase móvil}}$$

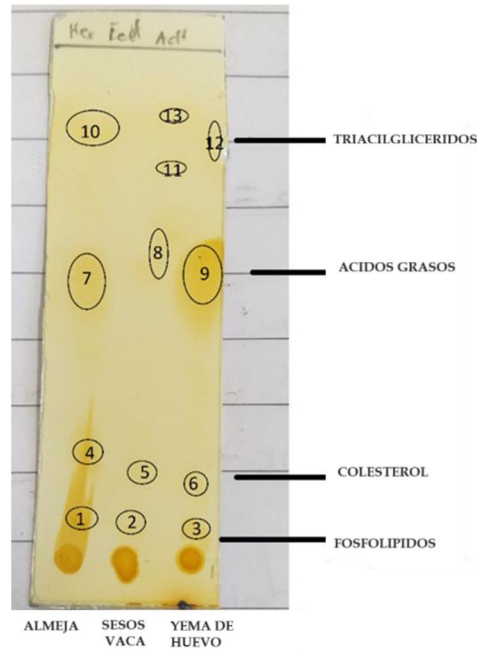


Figura 11: Análisis de lípidos neutros de la almeja por Cromatografía en capa fina.

Frente de la Fase Móvil = 7,6 cm

Rf o Relación de frentes:

$$Rf1 = \frac{0,9 \text{ cm}}{7,6 \text{ cm}} = 0,118$$

$$Rf2 = \frac{0,8 \text{ cm}}{7,6 \text{ cm}} = 0,105$$

$$Rf3 = \frac{0,5 \text{ cm}}{7,6 \text{ cm}} = 0,066$$

$$Rf4 = \frac{1,7 \text{ cm}}{7,6 \text{ cm}} = 0,224$$

$$Rf5 = \frac{1,5 \text{ cm}}{7,6 \text{ cm}} = 0,197$$

$$Rf6 = \frac{1,3 \text{ cm}}{7,6 \text{ cm}} = 0,171$$

$$Rf7 = \frac{4,3 \text{ cm}}{7,6 \text{ cm}} = 0,566$$

$$Rf8 = \frac{4,7 \text{ cm}}{7,6 \text{ cm}} = 0,618$$

$$Rf9 = \frac{4,3 \text{ cm}}{7,6 \text{ cm}} = 0,566$$

$$Rf10 = \frac{6,3 \text{ cm}}{7,6 \text{ cm}} = 0,829$$

$$Rf11 = \frac{5,8 \text{ cm}}{7,6 \text{ cm}} = 0,763$$

$$Rf12 = \frac{6,3 \text{ cm}}{7,6 \text{ cm}} = 0,829$$

$$Rf13 = \frac{6,6 \text{ cm}}{7,6 \text{ cm}} = 0,868$$

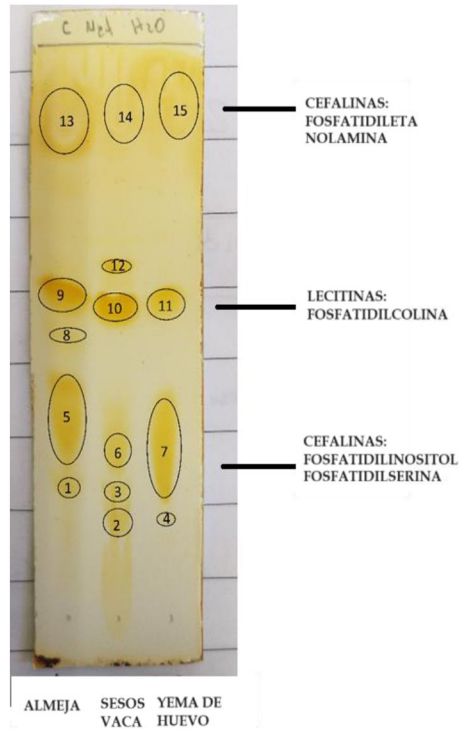


Figura 12: Análisis de fosfolípidos de la almeja por Cromatografía en capa fina.

Frente de la Fase Móvil = 7,6 cm

Rf o Relación de frentes:

$$Rf1 = \frac{1,6 \text{ cm}}{7,6 \text{ cm}} = 0,211$$

$$Rf2 = \frac{0,9 \text{ cm}}{7,6 \text{ cm}} = 0,118$$

$$Rf3 = \frac{1,5 \text{ cm}}{7,6 \text{ cm}} = 0,197$$

$$Rf4 = \frac{1,2 \text{ cm}}{7,6 \text{ cm}} = 0,158$$

$$Rf5 = \frac{2,7 \text{ cm}}{7,6 \text{ cm}} = 0,355$$

$$Rf6 = \frac{2,3 \text{ cm}}{7,6 \text{ cm}} = 0,303$$

$$Rf7 = \frac{2,4 \text{ cm}}{7,6 \text{ cm}} = 0,316$$

$$Rf8 = \frac{3,7 \text{ cm}}{7,6 \text{ cm}} = 0,487$$

$$Rf9 = \frac{4,3 \text{ cm}}{7,6 \text{ cm}} = 0,566$$

$$Rf10 = \frac{4,1 \text{ cm}}{7,6 \text{ cm}} = 0,539$$

$$Rf11 = \frac{4,1 \text{ cm}}{7,6 \text{ cm}} = 0,539$$

$$Rf12 = \frac{4,7 \text{ cm}}{7,6 \text{ cm}} = 0,618$$

$$Rf13 = \frac{6,7 \text{ cm}}{7,6 \text{ cm}} = 0,882$$

$$Rf14 = \frac{6,7 \text{ cm}}{7,6 \text{ cm}} = 0,882$$

$$Rf15 = \frac{6,7 \text{ cm}}{7,6 \text{ cm}} = 0,88$$

Analizando el Rf de cada compuesto, y comparando con muestras testigo, se puede concluir que la almeja posee lípidos como: ácidos grasos, colesterol, triacilglicéridos y fosfolípidos como lecitinas y cefalinas.

5.4. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE ÁCIDOS GRASOS

Luego de evaluar los cromatogramas obtenidos de la muestra de agosto (Fig. 12) y de la muestra de octubre (Fig. 13), se pudo determinar la composición porcentual de los ácidos grasos de la carne de almeja (Tablas 5 y 6 respectivamente).

Los AGS más abundantes fueron el C16:0 (palmítico) y el C18:0 (esteárico). La carne contiene un alto contenido de ácidos grasos insaturados (AGMI + AGPI) de 46,52 %. Entre los AGMI se destacan el C16:1 (palmitoleico), el C18:1n9c (oleico) y el C20:1n9 (eicosanoico). Entre los AGPI, que representan un total de 30,14 % en carne cruda de almeja, se destacan los ácidos grasos ω 3 C18:3n3 (linolénico), el C20:5n3 (EPA) y el C22:6n3. Entre los ω 6 se identificaron el C20:4n6 (araquidónico), el C18:1n9c (oleico) y C20:1n9 (eicosanoico). La relación ω 3/ ω 6 fue de 1,82. Cuando el cociente ω 3/ ω 6 es mayor a 0,1-0,2 se incrementa la disponibilidad y aprovechamiento de los AGPI ω 3, por el organismo humano. Esta especie a pesar de ser magra por su escaso valor de grasas totales, como todas las especies marinas de aguas frías, posee altos valores de AGPI ω 3 en su composición. El consumo de AGPI en la dieta es beneficioso en la prevención de las enfermedades cardiovasculares. (Valenzuela et al., 2011)

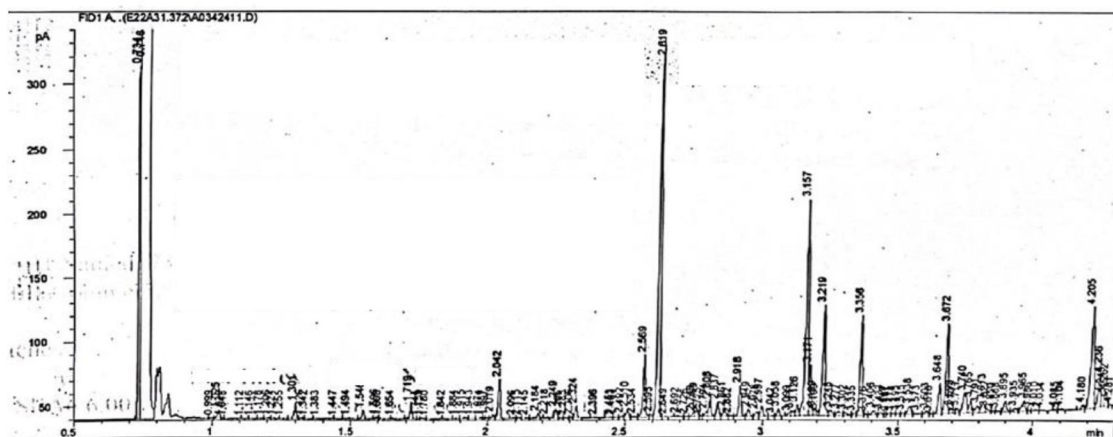


Figura 13: Cromatograma de almeja comestible. Muestra agosto.

Tabla 5. Composición porcentual de ácidos grasos identificados en carne cruda de almeja patagónica. Muestra agosto. AGS, ácidos grasos saturados; AGMI, ácidos grasos monoinsaturados; AGPI, ácidos grasos poliinsaturados.

Ácidos grasos (AGS)	%
C 10:0	0,08
C 12:0	0,8
C 14:0	3,35
C 16:0	33,39
C 17:0	2,9
C 18:0	11,76
C 20:0	1,59
Monoinsaturados (AGMI)	%
C 16:1	0,96
C 18:1n9c	22,35
C 18:1	0,32
C 20:1n9	1,27
Poliinsaturados (AGPI)	%
18:3n3	0,29
Otros	%
No identificados	20,94

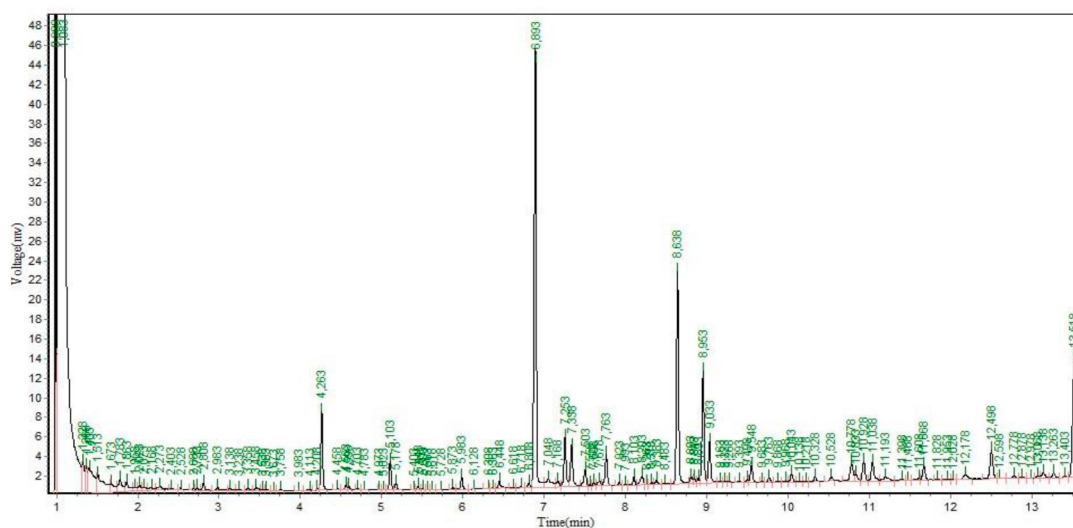


Figura 14: Cromatograma de almeja comestible. Muestra octubre.

Tabla 6: Composición porcentual de ácidos grasos de carne cruda de almeja patagónica. Muestra octubre. AGS, ácidos grasos saturados; AGMI, ácidos grasos monoinsaturados; AGPI, ácidos grasos poliinsaturados.

Ácidos grasos (AGS)	%
C 14:0	1,73
C 16:0	29,23
C 17:0	2,17
C 18:0	14,74
C 20:0	1,83
Monoinsaturados (AGMI)	%
C 16:1	6,53
C 18:1n9c	7,41
C 18:1	2,9
C 20:1n9	3,32
Poliinsaturados (AGPI)	%
18:3n3	5,79
20:4n6	3,78
20:5n3	11,65
22:6n3	8,92

La composición porcentual de los diferentes ácidos grasos en las muestras de agosto y octubre se muestra en las siguientes figuras (Fig. 15, 16 y 17).

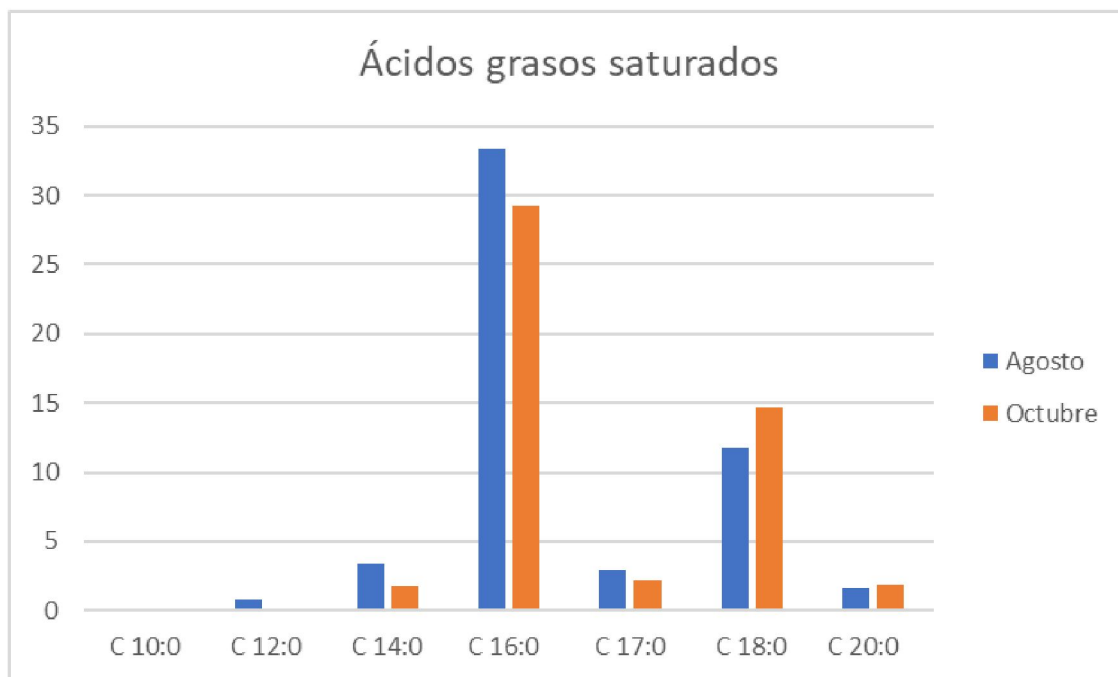


Figura 15: Contenido en porcentaje de ácidos grasos saturados (AGS) identificados en almeja

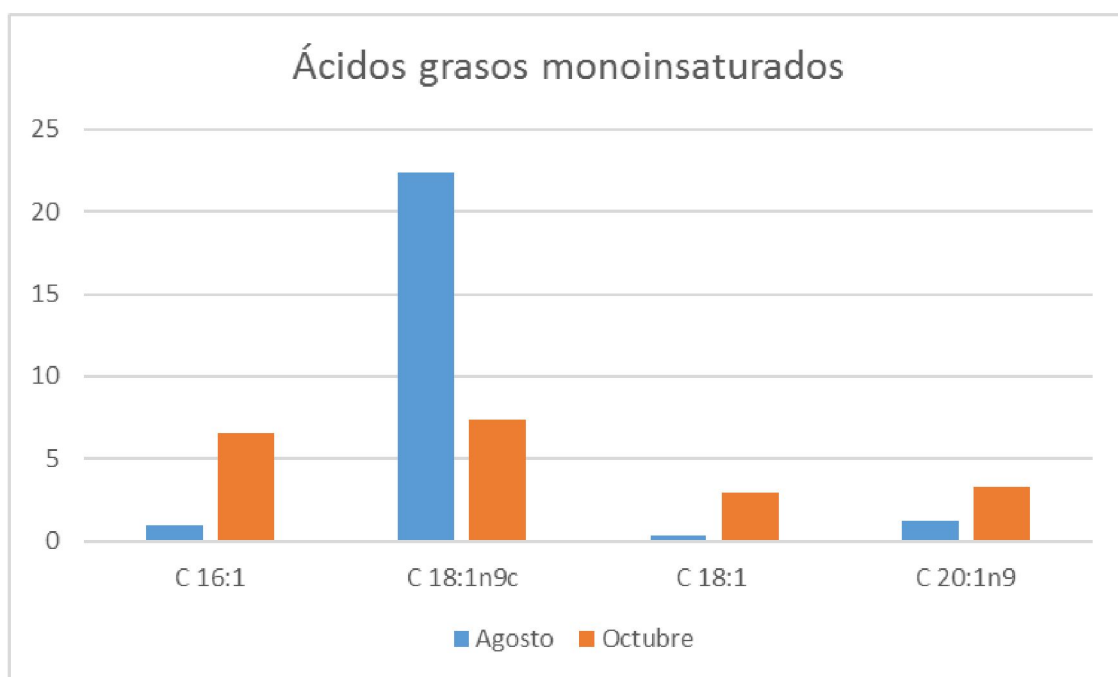


Figura 16: Contenido en porcentaje de ácidos grasos monoinsaturados (AGMI) en almeja

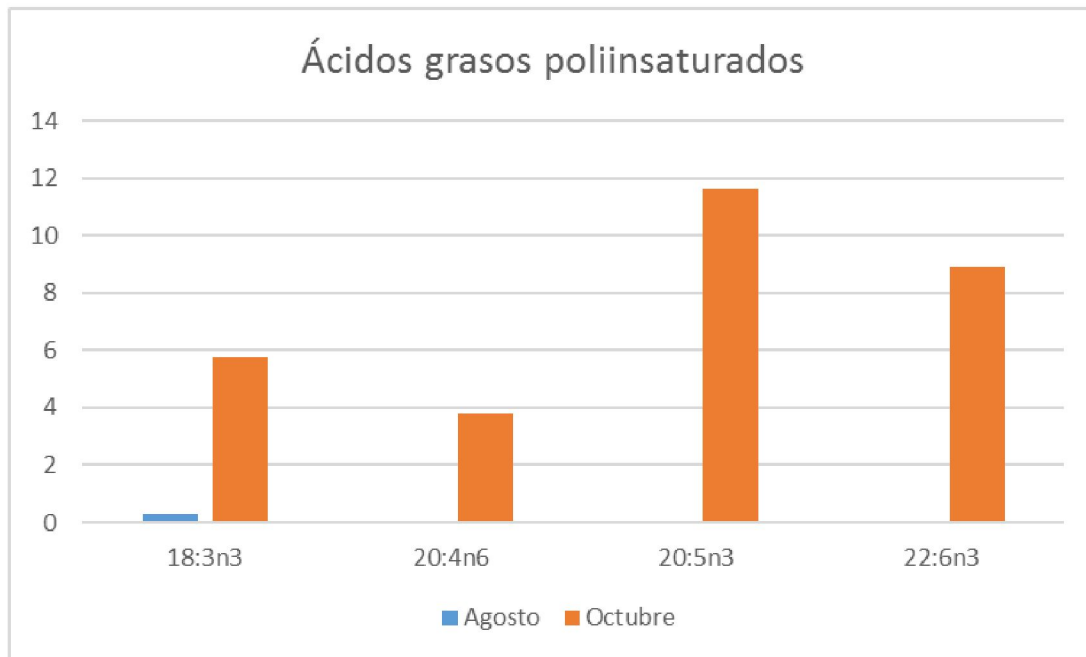


Figura 17: Contenido en porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) en almeja

5.5. CUANTIFICACIÓN DEL COLESTEROL

En la Figura 18 se observa la curva de calibración realizada con el estándar con el fin de calcular la concentración de colesterol en la carne cruda de almeja.

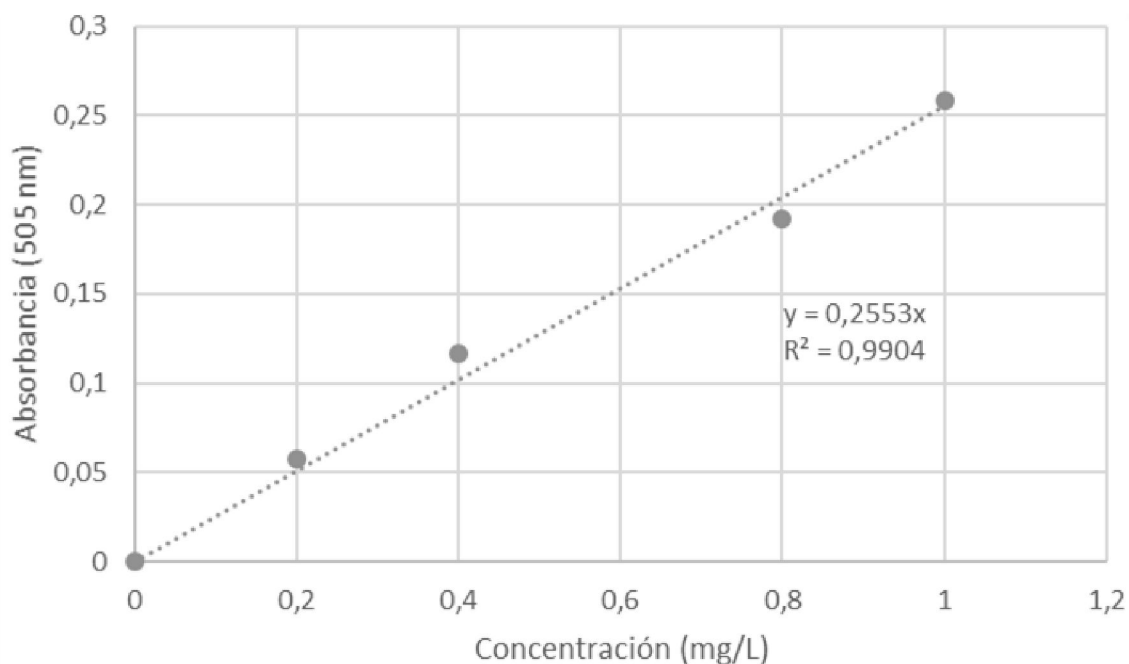


Figura 18: Curva de calibración para calcular la concentración de colesterol en muestras de almeja.

El valor de colesterol en la carne cruda de almeja patagónica fue de 75,2 mg% (mg/100 g de carne). Valores máximos similares fueron encontrados en las diferentes especies como: pulpo patagónico (*Enteroctopus megalocyathus*) 45,6 mg% (Crovetto et al., 2018), calamar (*Illex argentinus*) 85,9 mg%, centolla (*Lithodes santolla*) 51,9 mg%, langostilla (*Munida gregaria*) 68,9 mg%, langostino (*Pleoticus muelleri*) 38,9 mg% , mejillón (*Mytilus edulis*) 69 mg%, sombrerito (*Patinigera magellanica*) 87,1 mg% (Crovetto et al., 2007) , en pescados grasos como la anchoíta (*Engraulis anchoíta*) 192,9 mg% y en pescados magros como el abadejo (*Genypterus blacodes*) 27,1 mg% y el róbalo (*Eleginops maclovinus*) 39,1 mg% (Crovetto et al., 2009).

Los valores de colesterol son menores a 100 mg% al igual que en otros alimentos de origen animal (cordero y vaca 66 mg% (SARA 2, 2022), llama 39,0 mg% (Mamani-Linares, 2013)

6. CONCLUSIÓN

La especie estudiada mostró un contenido de grasa inferior a 1 %, que es menor al contenido de grasa en aves, cerdo y bovina, contribuyendo a la búsqueda de una alimentación cada vez más sana.

No se encontraron diferencias significativas en el porcentaje lipídico de las almejas muestreadas en agosto y octubre, lo que sugiere una estabilidad en este aspecto a lo largo de diferentes épocas del año, lo cual es relevante para la evaluación de su calidad nutricional y su valor comercial en distintas temporadas.

En la fracción lipídica, se identificó cualitativamente la presencia de triacilglicéridos, de colesterol y de fosfolípidos como lecitinas y cefalinas.

Se analizó el contenido de ácidos grasos en dos muestras diferentes. Si bien se encuentran diferencias en cuanto a los porcentajes de ácidos grasos saturados e insaturados encontrados, estas podrían deberse a que se utilizaron dos cromatógrafos diferentes para el análisis de los ácidos grasos, utilizando para su análisis patrones diferentes.

La importancia de los lípidos de la carne de almeja se centra en su bajo contenido en colesterol y en el valioso contenido de ácidos grasos insaturados como el oleico (C18:1, ω 9), y otros ácidos esenciales como el linolénico (C18:3) y el eicosapentaenoico (EPA, C20:5) ambos ω 3, con importantes funciones protectoras a nivel nervioso y circulatorio.

Se concluye que la carne de la almeja *Ameghinomya antiqua* es magra y es una fuente rica de ácidos grasos esenciales lo que sugiere su posible valor en la alimentación.

7. BIBLIOGRAFÍA

Alvarez H.M, Mayer F., Fabritius D., Steinbüchel A. 1996. Formation of intracytoplasmic lipid inclusions by *Rhodococcus opacus* strain PD630. Arch Microbiol. 165(6):377-86.

Bedregal Salinas Vega H. A. y Mollinedo Portugal P. 2022. Perfil lipídico de truchas, una breve revisión bibliográfica. *Rev. Bol. Quim.* 39: 2. ISSN 0250-5460. <https://doi.org/10.34098/2078-3949.39.2.2>

Bligh E.G. and Dyer W.J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. Can J Biochem Physiol. 37(8):911-917.

Centro Nacional de Información Biotecnológica. 2023. Resumen de compuestos de PubChem para CID 90470400, ÁCIDO cis-11,14,17-EICOSATRIENOICO. Obtenido el 16 de noviembre de 2023 de https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/cis-11_14_17-EICOSATRIENOIC-ACID.

Colombo J., Ovejero M.C., Varisco M., Guelfo R., Crovetto C., Mazzuca M., Risso S.J., Sánchez E.I. 2012. Estado nutricional y reproducción de *Mytilus edulis platensis*. VIII Jornadas Nacionales de Ciencias del Mar. XVI Coloquio de Oceanografía. C. Rivadavia, Chubut, Argentina.

Colombo J., Crovetto C., Varisco M., Risso S. 2016. Composición química proximal y perfil de ácidos grasos del mejillón (*Mytilus edulis*) provenientes de cultivos y bancos naturales en el golfo San Jorge, Argentina. *Biología Marina y Oceanográfica. Viña del Mar. Chile.* 51(2). Versión On-line ISSN 0718-1957.

Crovetto C., Alvarez V., Varisco M., Risso S. 2018. Determinación de lípidos y ácidos grasos en pulpo Patagónico (*Enteroctopus megalocyathus*). X Jornadas Nacionales de Ciencias del Mar. XVIII Coloquio Nacional de Oceanografía. 30 julio al 3 de agosto de 2018. FCEyN. UBA. BsA. ISBN 978-987-42-9493-7

Crovetto C., Varisco M., Barrientos E., Sánchez E. y Risso S. 2007. Contenido de colesterol en mariscos comerciales patagónicos. *Naturalia Patagónica* 3(2), 37-44.

Crovetto C., Sánchez E. y Risso S. 2009. Estudio de colesterol en peces marinos: Abadejo (*Genypterus blacodes*), Anchoíta (*Engraulis anchoita*) y Róbalo (*Eleginops maclovinus*) *Naturalia Patagónica* 4(2), 23-27.

Deranieh R.M., Joshi A.S., Greenberg M.L. 2013. Thin-layer chromatography of phospholipids. *Methods Mol Biol.* 1033:21-7. doi: 10.1007/978-1-62703-487-6_2.

Feduchi Canosa E., Carlos Romero M., Yáñez Conde C., García-Hoz Jiménez C. 2021. *Bioquímica. Conceptos esenciales.* 3ª edición. Editorial Medica Panamericana.

González Buitrago J. 1990. *Tecnología y métodos del Laboratorio clínico.* Editorial Salvat. ISBN 84-345-2078-8.

lideNut Bioquímica clínica nutricional. 2018. Clasificación actualizada de lípidos. <https://www.iidenut.org/instituto/2018/10/16/clasificacion-actualizada-de-los-lipidos/>

Mamani-Linares L.W. y Gallo CB. 2013. Meat quality attributes of the *Longissimus lumborum* muscle of the Kh'ara genotype of llama (*Lama glama*) reared extensively in northern Chile. *Meat Sci* 94:89–94.

Miscoria S., Tritto E., Crovetto C., Varisco M., Risso S. y Sánchez E.I. 2012. Evaluación quimiométrica de los valores de colesterol obtenidos para *Mytilus edulis platensis*. VIII Jornadas Nacionales de Ciencias del Mar. XVI Coloquio de Oceanografía. C. Rivadavia, Chubut, Argentina.

Nelson, D. L., y Cox, M. M. 2017. *Lehninger. Principios de bioquímica.* Ediciones Omega.

Ovejero M.C., Colombo J., Varisco M., Guelfo R., Crovetto C., Mazzuca M., Risso S. y, Sánchez E.I. 2012. Valores energéticos de la lapa *Nacella magellanica*. VIII Jornadas Nacionales de Ciencias del Mar. XVI Coloquio de Oceanografía. C. Rivadavia, Chubut, Argentina.

Saldanha T., Mazalli M. y Bragagnolo N. 2004. Avaliação comparativa entre dois métodos para determinação do colesterol em carnes e leite. *Food Sci. Technol* 24 (1): 109-113.

SARA 2: 2022. Tabla de composición química de alimentos para Argentina: compilación para ENNyS 2, 1a Edición, Argentina, Ministerio de Salud de la Nación.

Tamargo-Santos B., Herrera-Belén L., Bello-Alarcón A., Cuéllar A., González-Rodríguez H., Sierra-González G., Morales-González M. y Ortiz-Zamora L. 2011. Obtención de fosfolípidos a partir de la lecitina de soya (*Glicine max L*), para usos biomédicos. *Cubana de Química*, XXIII 3: 5-14.

Túnez Fiñana I. y Muñoz M. Cromatografía en capa fina de lípidos. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Córdoba, Avda. Menéndez Pidal s/n, 14004-Córdoba.

Valenzuela B., Alfonso Sanhueza C. y Nieto K. 2002. El uso de lípidos estructurados en la nutrición: una tecnología que abre nuevas perspectivas en el desarrollo de productos innovadores. *Revista chilena de nutrición*, 29(2), 106-115. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182002000200005>.

Valenzuela R., Tapia G., González M. y Valenzuela A. 2011. Ácidos grasos omega-3 (EPA y DHA) y su aplicación en diversas situaciones clínicas. *Rev. chil. nutr.* 38 (3): 356-367. ISSN 0717-7518. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182011000300011>.

Varisco M., Crovetto C., Colombo J., Vinuesa J., Riso S. 2020. Proximate composition and nutritional quality of the meat of the squat lobster *Munida gregaria* (Fabricius 1973). *Journal of Aquatic Food Product Technology* 29: 229-237