

**EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS PRESENTES EN LA
HORMIGA “CULONA” (*Atta laevigata*)**

ELKIN DARÍO RUEDA PARRA

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2004**

**EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS PRESENTES EN LA
HORMIGA “CULONA” (*Atta laevigata*)**

ELKIN DARÍO RUEDA PARRA

**Trabajo presentado como requisito
parcial para optar al título de Químico**

**Directora: ELENA E. STASHENKO,
Química, Ph.D.**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2004**

El derecho a una alimentación adecuada debe ser el más elemental, el más indiscutible de los derechos del hombre.

Declaración de un político argelino.

DEDICATORIA

A DIOS, mi fortaleza y refugio espiritual;

A mi hijo Juan Sebastián, inspiración de mi vida;

A mi Esposa Mireya, compañera incondicional que confío ciegamente en mí, sin esperar nada a cambio;

A mis padres, Ana Dolores y Rodolfo (Q.E.P.D); que se esmeraron por darme lo mejor y porque creyeron en mi;

A mis Hermanos, Luz Delly, Adriana, Yaqueline, Patricia, Yaneth, Lina, Robinson, Willintong y Edinson Geovanny, que me apoyaron y me entendieron durante estos largos años de estudio;

A mis sobrinos, quienes tanto quiero.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento sincero a todas aquellas personas que contribuyeron en la realización del presente trabajo de investigación, especialmente a:

A la Dra Elena Stashenko, por su confianza, por sus excelentes aportes como docente y directora y por sus lecciones de vida;

Al Dr Jairo Rene por sus oportunos aportes académicos;

A mis amigos y compañeros del Laboratorio de Cromatografía, quienes me colaboraron y ayudaron durante estos años de permanencia en el laboratorio;

A mis profesores, por su excelente labor docente;

A Edwin, Gloria, Jose Luis, Bibiana y Sulay, amigos incondicionales, con los cuales compartimos gratos y tristes momentos;

A esos estudiantes luchadores que hicieron posible la existencia del servicio de los Comedores Estudiantiles en esta Universidad, pues sin éste, mi proceso de formación universitaria hubiese sido casi imposible;

A mí maltratado, humillado y ultrajado, pueblito colombiano, quien sustentó económicamente mi carrera;

Y, a mi Alma Mater – Universidad Industrial de Santander-.

TABLA DE CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	18
1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL	22
1.1 <i>Atta laevigata</i>	22
1.1.1 Antecedentes biológicos	22
1.1.2 Taxonomía de la <i>Atta laevigata</i>	25
1.1.3 Morfología de la <i>Atta laevigata</i>	25
1.1.4 Castas sociales de la <i>Atta laevigata</i>	26
1.1.5 Composición nutricional de la <i>Atta laevigata</i>	26
1.1.6 Valor nutritivo de la <i>Atta laevigata</i> comparado con otros alimentos	26
1.1.7 Descripción del procesamiento de la <i>Atta laevigata</i>	27
1.1.8 Embalaje	28
1.1.9 Almacenamiento y conservación	28
1.2 LÍPIDOS	29
1.2.1 Clasificación	29
1.2.2 Función de los lípidos	30
1.2.3 Extracción de lípidos	31
1.3 ÁCIDOS GRASOS	32
1.3.1 Definición	32
1.3.2 Características estructurales de los ácidos grasos	32
1.3.3 Ácidos grasos saturados	33
1.3.4 Ácidos grasos monoinsaturados	33
1.3.5 Ácidos grasos poliinsaturados	34
1.3.6 Importancia nutricional de los ácidos grasos	34
1.3.7 Fuentes naturales de ácidos grasos	35
1.3.8 Análisis de ácidos grasos mediante cromatografía de gases	36

1.3.9	Derivación de ácidos grasos	38
1.4	Transesterificación <i>in situ</i>	41
2	METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	39
2.1	REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS DE LABORATORIO	42
2.2	MUESTRAS	43
2.2.1	Recolección de las muestras	43
2.2.2	Taxonomía de la <i>Atta laevigata</i>	44
2.2.3	Preparación de las muestras	44
2.2.4	Tratamiento de las muestras	44
2.3	EXTRACCIÓN, IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS	45
2.3.1	Extracción de grasa	45
2.3.2	Conversión de ácidos grasos a sus ésteres metílicos	45
2.3.3	Identificación de ácidos grasos	47
2.3.4	Cuantificación de ácidos grasos	47
2.4	PARÁMETROS ANALÍTICOS	48
2.5	ESTUDIO DE LA REPRODUCIBILIDAD DE LOS t_R , t_{RR} , Y ÁREAS DE PICOS DE LOS FAME`s	48
2.6	TRANSESTERIFICACIÓN <i>in situ</i>	50
3	ANÁLISIS DE RESULTADOS	51
3.1	REPRODUCIBILIDAD DE LOS PARÁMETROS CROMATOGRÁFICOS	51
3.1.1	Tiempos de retención	51
3.1.2	Tiempos de retención relativos	53
3.1.3	Áreas y áreas relativas	54
3.2	EFFECTO DEL TIEMPO DE CALENTAMIENTO SOBRE LA TRANSESTERIFICACIÓN	55
3.3	CONTENIDO DE ÁCIDOS GRASOS EN LA <i>Atta laevigata</i>	56
3.3.1	Contenido de grasa en la <i>Atta laevigata</i>	59

3.3.2	Comparación de ácidos grasos presentes en <i>Atta laevigata</i> antes y después del procesamiento de las hormigas	60
3.3.3	Comparación de ácidos grasos presentes en <i>Atta laevigata</i> y en algunos aceites vegetales	61
3.4	IDENTIFICACIÓN DE FA'S EN <i>Atta laevigata</i> MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS	63
4	CONCLUSIONES	66
5	RECOMENDACIONES	68
	BIBLIOGRAFÍA	69
	ANEXOS	82

LISTA DE TABLAS

		pág.
Tabla 1	Taxonomía de la hormiga “culona” y su nombre científico	25
Tabla 2	Composición nutricional de <i>Atta laevigata</i>	26
Tabla 3	Valor nutritivo de <i>Atta laevigata</i> comparado con otros alimentos	27
Tabla 4	Clasificación de los lípidos según su estructura química	29
Tabla 5	Ácidos grasos saturados más comunes en fuentes naturales	33
Tabla 6	Ácidos grasos monoinsaturados de importancia fisiológica y nutricional	34
Tabla 7	Ácidos grasos poliinsaturados de importancia fisiológica y nutricional	34
Tabla 8	Fuentes naturales más comunes de ácidos grasos	35
Tabla 9	Ésteres de ácidos grasos más utilizados en el análisis por GC	37
Tabla 10	Sustancias químicas, empleadas en este proyecto	42
Tabla 11	Estudio de la reproducibilidad de los tiempos de retención (t_R) de ésteres metílicos de ácidos grasos	51
Tabla 12	Estudio de la reproducibilidad de los tiempos de retención relativos (t_{RR}) de la mezcla certificada de FAME`s corridos en una columna DB-5MS	53
Tabla 13	Estudio de la reproducibilidad de las áreas y áreas relativas de la mezcla certificada de FAME`s	54
Tabla 14	Concentración promedio de FA`s presentes en la HC, obtenidos por: A. Extracción con solvente seguida de derivación; y B. Transesterificación <i>in situ</i>	58
Tabla 15	Composición relativa (%) promedio de los FA`s presentes en la HC antes y después de ser procesadas, empleando el método ISTE	60
Tabla 16	Comparación del contenido de FA`s presentes en la HC y en algunos aceites vegetales	61

LISTA DE FIGURAS

		pág.
Figura 1	Fotografía de una hormiga “culona” (<i>Atta laevigata</i>)	22
Figura 2	Fotografía de las hormigas <i>Atta laevigata</i> , después de ser sometidas al proceso de tostado	24
Figura 3	Embalajes más comunes de <i>Atta laevigata</i> , encontrados en el mercado	28
Figura 4	Dispositivo utilizado para llevar a cabo las reacciones de transesterificación	46
Figura 5	Cromatógrafo de gases <i>Agilent Technologies</i> HP 6890 <i>Plus</i> , equipado con un detector selectivo de masas <i>Agilent Technologies</i> 5973 N	49
Figura 6	Cromatograma típico obtenido de la mezcla certificada de ésteres metílicos de ácidos grasos	52
Figura 7	Efecto del tiempo de calentamiento sobre la transesterificación de un patrón de triestearina a su respectivo éster metílico	53
Figura 8	Perfiles cromatográficos típicos de FA`s presentes en la HC, obtenidos por dos técnicas de extracción: A. extracción con solvente seguido de derivación; y B. Extracción - derivación simultánea o transesterificación <i>in situ</i> (ISTE)	57
Figura 9	Comparación del contenido de grasa saturada e insaturada en la HC, empleando diferentes técnicas de extracción	59
Figura 10	Perfiles cromatográficos típicos de FA`s presentes en: A. HC; B. Girasol; C. Oliva; D. Soya; E. Semilla de cedro y F. Oleína de Palma	62
Figura 11	Espectro de masas del éster metílico del ácido palmítico	64
Figura 12	Espectro de masas del éster metílico del ácido oleico	65

LISTA DE ESQUEMAS

		pág.
Esquema 1	Transesterificación de lípidos catalizada por ácidos	39
Esquema 2	Transesterificación de lípidos catalizada por bases	40
Esquema 3	Fragmentación típica del éster metílico del ácido palmítico	64
Esquema 4	Fragmentación típica del éster metílico del ácido oléico	65

LISTA DE ANEXOS

	pág.
ANEXO 1 Espectros de masas de los FA`s presentes en la HC, en forma de sus ésteres metílicos	82

ABREVIATURAS

AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i> (Asociación Oficial de Químicos Analíticos)
AOCS	<i>American Oil Chemists' Society</i> (Sociedad Americana de Químicos del Aceite)
EFA	<i>Essential Fatty Acid</i> [Ácido(s) graso(s) esencial(es)]
FA	<i>Fatty Acid</i> [Ácido(s) graso(s)]
FAME`s	<i>Fatty Acid Methyl Esters</i> (Ésteres metílicos de ácidos grasos)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (Administración de Drogas y Alimentos)
FID	<i>Flame Ionization Detector</i> (Detector de ionización en llama)
GC	<i>Gas Chromatography</i> (Cromatografía de gases, cromatógrafo de gases)
GC-MS	<i>Gas Chromatography - Mass Spectrometry</i> (Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas)
HC	Hormiga "Culona" (<i>Atta laevigata</i>)
ISTD	<i>Internal standard</i> (estándar interno)
ISTE	<i>In situ transesterification</i> (transesterificación <i>in situ</i>)
MSD	<i>Mass Selective Detector</i> (Detector selectivo de masas)

NLEA	<i>Nutrition Labeling and Education Act</i> (Acta de Educación y Etiquetado Nutricional)
PUFA`s	<i>Poliunsaturated Fatty Acids</i> (Ácidos grasos poliinsaturados)
SFA`s	<i>Saturated Fatty Acids</i> (Ácidos grasos saturados)
TAG	Triacilglicéridos
t_R	Tiempo de retención
t_{RR}	Tiempo de retención relativo
UFA`s	<i>Unsaturated Fatty Acids</i> (Ácidos grasos insaturados)

TÍTULO

EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS PRESENTES EN LA HORMIGA “CULONA” (*Atta laevigata*)*.

AUTOR

Elkin Darío Rueda Parra**

PALABRAS CLAVES:

FAME`s, Transesterificación *in situ*, *Atta laevigata*.

RESUMEN

El análisis de ácidos grasos (FA`s) en tejidos de origen animal es complejo, pues requiere de extensos y laboriosos procedimientos de extracción seguidos de transesterificación.

En este proyecto, se determinó la composición de FA`s de *Atta laevigata*, la cual fue comparada con varios aceites comerciales de origen vegetal. *Atta laevigata*, conocida comúnmente como hormiga “Culona” (HC), se caracteriza por poseer un gran abdomen lleno de huevos y se consume en Santander como un plato típico.

Dos métodos de preparación de muestras fueron empleados en este proyecto. En el primer procedimiento (A), la fracción lípida fue primero extraída con solvente, utilizando para tal fin una mezcla de cloroformo: metanol, 2:1 (v/v), en seguida los triacilglicéridos de la fracción lípida se transesterificaron a sus ésteres metílicos (FAME`s), utilizando BF₃ en metanol como catalizador. En el segundo procedimiento (B), la formación de los FAME`s se llevó a cabo directamente en la muestra, mediante el método de transesterificación *in situ*.

La composición de FA`s encontrada para los dos procedimientos se reporta a continuación:

Método	Concentración de FA`s en la HC (mg FA`s / 100mg de HC) *							
	C14:0	C16:0	C16:1	C16:1**	C18:0	C18:1	C18:2	C20:0
A	-	6.09 ± 0.4	0.060 ± 0.005	-	2.66 ± 0.06	19.7 ± 0.8	0.27 ± 0.02	-
B	0.040 ± 0.002	6.5 ± 0.6	0.070 ± 0.006	0.010± 0.001	2.71 ± 0.07	19.3 ± 0.9	0.30 ± 0.03	0.010 ± 0.009

** Isómero C16:1

La identificación de los FAME`s en las muestras de la HC, se llevó a cabo mediante la comparación de los t_R de sus ésteres metílicos, con los de una mezcla de estándares certificados, analizados bajo las mismas condiciones cromatográficas. La confirmación estructural de los FA`s se realizó con base en sus espectros de masas.

*Tesis

**Facultad de ciencias, Escuela de química, Elena Stashenko

TITLE**EXTRATION AND ANALYSIS OF “CULONA” ANT (*Atta laevigata*) FATTY ACIDS*.****AUTHOR**

Elkin Darío Rueda Parra**

KEYWORDSFAME, *In situ* transesterification, *Atta laevigata*.**ABSTRACT**

Animal tissue analysis for fatty acids is complex, because it needs large and laborious extraction procedures followed by transesterification.

In this research the *Atta laevigata* fatty acids composition was determined and was compared with several comercial vegetable oils. *Atta laevigata* is well known as “Culona” ant and it is characterized for having a big abdomen full of eggs and is consumed in Santander as a typical dish.

Two methods were used for sample preparation. In the first one (A), the lipid fraction was extracted with solvent, (chloroform : methanol, 2:1 v/v), and the triacylglycerides were transesterified to their fatty acids methyl esters (FAME) using methanolic BF₃.

In the second method (B), the formation of the FAME was directly done on the fatty sample using *in situ* transesterification.

Fatty acids composition determined by the two procedures was as indicated in the following table:

Method	Fatty acids concentration on the “Culona” ant (mg / 100mg of sample) *							
	C14:0	C16:0	C16:1	C16:1**	C18:0	C18:1	C18:2	C20:0
A	-	6.09 ± 0.4	0.060 ± 0.005	-	2.66 ± 0.06	19.7 ± 0.8	0.27 ± 0.02	-
B	0.040 ± 0.002	6.5 ± 0.6	0.070 ± 0.006	0.010± 0.001	2.71 ± 0.07	19.3 ± 0.9	0.30 ± 0.03	0.010 ± 0.009

** Isomer C16:1

FAME identification was based on comparison of their retention times with those of a fatty acid methyl esters standard mixture wich were analyzed under the same chromatographic conditions. Fatty acid structural confirmation was made based on their mass spectra.

*Thesis

**Faculty of Sciences, School of Chemistry, Elena Stashenko

INTRODUCCIÓN

En años recientes, el análisis de ácidos grasos (FA`s) ha tenido gran importancia debido a las implicaciones que ello ha tenido tanto para la nutrición, como para la salud humana. En 1994, Ascherio y Willett [1997] calcularon que más de 30000 muertes al año en EE.UU. podrían deberse al consumo de grasa parcialmente hidrogenada, la cual tiene efectos negativos sobre los perfiles lipoprotéicos. Ha surgido también un gran interés por el consumo y el análisis de fuentes naturales que suministren ácidos grasos esenciales (EFA`s) del grupo ω -3 y ω -6, los cuales presentan una relación benéfica para prevenir enfermedades crónicas tales como la arteriosclerosis, la colesterolemia, la artritis reumática [Soberman,1990], entre otras. Tal es el caso de los esquimales en Groenlandia, que muestran una incidencia muy baja de dichas enfermedades, la cual ha sido atribuida a su tradicional dieta, consistente, en gran parte, de alimentos ricos en este tipo de ácidos (C22:6 y C20:5) [Yaniv *et al.*, 1999]. El consumo de FA`s no excluye a grupo humano alguno; en mujeres embarazadas, influye sobre la formación del cerebro del feto; los FA`s están asociados estrechamente con procesos vinculados con el desarrollo del sistema nervioso central; cumplen funciones a nivel visual y cerebral [Mariane, 1998], ejercen una acción antitrombica en los seres vivos [Casado, 2001; Friedbergh *et. al.*,1998].

El análisis de FA`s en tejidos de origen animal requiere de extensos y laboriosos procedimientos. El desarrollo de la cromatografía de gases (GC) a mediados de la década de los 1950`s, revolucionó el análisis de los lípidos, ya que hizo posible la determinación completa de FA`s en tiempos muy cortos [Christie; 1989]. Para este propósito, los FA`s que componen los lípidos, son convertidos a sus correspondientes ésteres metílicos [Rueda *et al.*, 2003; Carrapiso, 2000], isopropílicos [Chardigny, 1995] o butílicos [Destailats, 2002], antes del análisis cromatográfico, para aumentar su volatilidad y mejorar la forma de los picos. Con

el fin de obtener una mejor separación por GC, Metcalfe y Schmitz [1961] determinaron que BF_3 en metanol es un reactivo apropiado para la derivación de FA`s, resultado que fue aceptado en 1969 por la *American Oil Chemist`s Society* [AOCS] como método oficial; en el año 1999 esta técnica fue implementada y validada por Hernán Fuentes en el Laboratorio de Cromatografía del Centro de Investigación en Biomoléculas, CIBIMOL, UIS [Fuentes, 1999].

Además, el análisis de FA`s proporciona información sobre el contenido promedio de grasa [Ngeh-Ngwainbi y Chandler, 1997], basado en la definición de grasa total establecida bajo la *Nutrition Labeling and Education Act* (NLEA) [Federal Register, 1993].

Para determinar FA`s en matrices de origen animal, se emplean varias metodologías. Entre los procedimientos más utilizados está la extracción de lípidos, usando la mezcla de solventes, e.g. cloroformo:metanol, 2:1 (v/v) [Folch *et al.*, 1957] y esterificación de los FA`s a los correspondientes ésteres metílicos (FAME`s) [Cava *et al.*, 1997]. Otros métodos reportados incluyen saponificación directa y saponificación post-extracción. Sin embargo, el proceso de extracción con cloroformo:metanol, seguido de saponificación, consume tiempo [Lepage y Roy, 1986], grandes cantidades de muestras y reactivos frecuentemente tóxicos y costosos. Aunque el procedimiento de extracción de lípidos ha tenido algunas mejoras [Brooks *et al.*, 1998; Erickson, 1993], éste no siempre es conveniente, puesto que puede presentar algunas interferencias tales como co-extracción de ceras, pigmentos [Palmquist y Jenkins, 1980] y pequeñas cantidades de proteínas [Erickson, 1993]. Una extracción ineficiente de los lípidos contenidos en la matriz bajo estudio puede repercutir en resultados de análisis erróneos, si se desea determinar la composición de FA`s. Sin embargo, un método interesante y novedoso que omite la etapa de extracción de la grasa, y en el cual los FAME`s son preparados directamente por transesterificación *in situ* (ISTE) fue reportado por primera vez en el año de 1963 por Abel *et al.* Este método ha sido el centro de

atención durante las últimas décadas como técnica alternativa para analizar FA`s. En 1972 Drucker utilizó este método para determinar FA`s en muestras biológicas, alcanzando exactitud y recuperación mayores, que los obtenidos por métodos convencionales [Satler *et. al.*, 1991; Rodríguez-Palmero *et. al.*, 1997]. Resultados similares fueron obtenidos por Park y Goins [1994], al analizar muestras de leche materna, carne bovina, trucha arco iris, yema de huevo e hígado de becerro.

En la presente investigación se determinó el contenido de FA`s en *Atta laevigata* mediante cromatografía de gases de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (HRGC/MS). *Atta laevigata*, conocida comúnmente como hormiga “Culona” (HC), es una hormiga del género de las hormigas arrieras u hormigas cogedoras de hojas, pertenecientes a la familia *Formicidae*. La HC ha sido fuente de inspiración para muchos artistas, pintores y músicos de Santander, a tal punto, que es considerada como insignia y símbolo de la región. Esta hormiga se caracteriza por poseer un gran abdomen, lleno de huevos, y se consume en Santander como un plato típico. La determinación de FA`s de la HC se realizó por dos técnicas de preparación de muestra. En el primer procedimiento, la fracción lípida fue extraída con solvente, utilizando para tal fin una mezcla de cloroformo:metanol 2:1 (v/v), según el método propuesto por Folch *et al.* [1957]. Los triacilgliceridos (TAG) de la fracción lípida se convirtieron luego a sus correspondientes FAME`s, utilizando BF₃ metanólico como catalizador. En el segundo procedimiento, la formación de los ésteres metílicos se llevó a cabo directamente en la muestra, por calentamiento con NaOH en metanol (saponificación), seguido de la reacción de esterificación con BF₃ metanólico.

La identificación de los FA`s en la HC se realizó por comparación de los tiempos de retención (t_R) de sus ésteres metílicos, con los de una mezcla de estándares certificados, analizados bajo las mismas condiciones cromatográficas. La confirmación estructural de los FA`s se realizó con base en sus espectros de masas. La cuantificación de los FA`s se llevó a cabo mediante el método de

normalización interna, según la norma ISO 5508 (*Animal and Vegetable Fats and Oil- Analysis by Gas Chromatography of Methyl Esters of Fatty Acids*) [ISO 5508, 1990]. Los resultados obtenidos fueron comparados con los análisis de la composición de FA`s de varios aceites comerciales de origen vegetal.

El desarrollo del presente trabajo contribuye al conocimiento científico sobre el valor nutricional de la hormiga “culona”, al determinar el contenido de sus ácidos grasos. Se espera que este trabajo sea un aporte y ayuda para aquellos pequeños vendedores y exportadores de la HC, una motivación para ellos, puesto que podrán suministrar la información sobre el valor nutricional de su producto, y el contenido de grasa, tal como lo recomienda y lo establece la FDA (*Food and Drug Administration*) y el Codex alimentario.

El presente trabajo, ofrece también una herramienta muy valiosa para determinar FA`s en fuentes de origen animal y en alimentos, ya que la metodología empleada (ISTE), es relativamente más sencilla, rápida, eficiente y económica que la metodología convencional utilizada que se utiliza actualmente en la mayoría de laboratorios de alimentos.

Es de resaltar, que parte del trabajo realizado en esta investigación fue presentado en el tercer Simposio Internacional sobre separación en Biociencias, que tuvo lugar en Moscú (Rusia) durante los días 13-18 de mayo de 2003, así como en la I Semana Nacional de Química, organizada en Bucaramanga durante los días 27-31 de octubre de 2003.

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

1.1 *Atta laevigata*

1.1.1 Antecedentes biológicos: Las HC (**Figura 1**) pertenecen a un género de las hormigas arrieras u hormigas cortadoras de hojas, que son exclusivas del Nuevo Mundo [Franco, 2000].

Figura 1. Fotografía de una hormiga “culona” (*Atta laevigata*).



El impacto provocado por estas hormigas sobre la comunidad vegetal, ha llevado a considerarlas como los principales herbívoros de los trópicos y subtrópicos [Weber, 1966]. La HC constituye una peste muy seria en la agricultura, la ganadería y la silvicultura en diferentes países americanos [Braganca, 2002]; su actividad desfoliadora remueve ca. 15 % de la producción total de hojas en los bosques tropicales [Ortega, 1999].

Las hormigas arrieras han pasado a ser plagas agrícolas importantes en Colombia, ya que cortan hojas de cultivos como la yuca, los pastos, el café, los cítricos, etc., reduciendo significativamente su producción [Serna, 1999].

La biomasa cosechada no es consumida directamente por las hormigas sino es desmenuzada hasta formar una pasta que servirá de sustrato para el crecimiento de un hongo, llamado *Attamyces bromatificus* [Serna, 1999]. El hongo es traído por la reina madre en su cavidad bucal desde el nido del cual partió y constituye el único alimento de la reina, de las larvas y, ocasionalmente, de las obreras [Medina, 2003].

El hongo presenta más del 50% del peso seco disponible como nutriente soluble, más del 27% del peso seco son carbohidratos; contiene 20 aminoácidos libres, con excepción de las cisteína y aspargina; no posee polisacáridos y la fracción lípida contiene ergosterol como el mayor estero. De esta forma, el hongo provee a las HC una rica y completa fuente alimenticia [Serna, 1999]. El papel bioquímico (cambios fisiológicos) del hongo consiste en producir tanasas y polifenol oxidasas y en la habilidad para desnaturalizar los análogos de la hormona juvenil, que tienen los vegetales para defenderse de los insectos [Medina, 2003].

La principal adaptación fisiológica de las hormigas, fue un cambio en el sistema glandular exocrino (producción de feromonas) y las glándulas metapleurales en las cuales se producen el ácido fenil-acético, que actúa contra bacterias y hongos, y el ácido indol-acético, el cual impide la germinación de semillas y esporas. Las feromonas, - sustancias químicas excretadas por animales, que provocan una alteración y/o cambio de comportamiento, a otro de la misma especie – presentes en la HC, son utilizadas para marcar su territorio, y atraer a los zánganos copulantes. Algunas feromonas, aisladas de la HC, se reportan a continuación [Reckziegel *et. al*, 2002; Salzemann, 1992]:

(9Z)-9-Heptadeceno; 8,11-Nonadecadieno; (9Z)-9-Tricoseno; 4-Metil-3-heptanol; 4-Metil-3-heptanona y 3,5-Dimetil-1-nonanol (encontrado exclusivamente en reinas vírgenes).

Las colonias de la HC son monógamas, es decir, tienen una sola reina, que si se muere o si se extrae del hormiguero, éste se acaba, la reina es irremplazable. La hormiga reina vive normalmente 14 años, pero algunas llegan hasta los 20; una hormiga obrera soldado vive 2 años; las cargadoras, cortadoras, jardineras y nodrizas viven 6 meses; los zánganos copuladores llegan a vivir hasta 4 meses.

Las HC se caracterizan por elaborar nidos subterráneos formados por complejas cámaras interconectadas por túneles que le servirán como sistemas de ventilación. Los nidos contienen cámaras destinadas como basureros, cámaras destinadas para el desarrollo y cuidado de la cría (huevos, larvas, pulpas) y cámaras para el cultivo del hongo [Serna, 1999].

Se considera que un hormiguero está maduro cuando tiene tres años ca.; tiempo en el cual se encuentra listo para formar nuevas colonias anualmente. En este momento, la reina coloca huevos haploides y diploides que van a dar origen a zánganos y reinas aladas respectivamente, coincidiendo su emergencia con las épocas lluviosas (en Colombia, abril-mayo y octubre-noviembre); debido quizás a que ésto favorece la humedad y friabilidad del suelo; condición necesaria para que la reina, después de ser fecundada en el “vuelo nupcial”, cave con facilidad y rápidamente su primera cámara [Serna, 1999].

Cuando es el momento, hembras y machos provenientes de diferentes hormigueros salen a volar en grupo, en cierto espacio del aire llamado “zona de apareamiento” donde se produce la cópula de la reina (una sola vez en su vida) con varios zánganos que proceden de hormigueros distintos, posibilitando así la recombinación genética. No obstante la reina almacena en su espermoteca los espermatozoides de cada zángano (puede recibir hasta 130 millones) en “paqueticos” separados, de tal manera que habrá tiempos en la colonia en los cuales la población pertenece a un mismo padre. La reina es partenogénica y puede poner entre 3 y 5 mil huevos diarios [Medina, 2003].

La HC tiene muchos enemigos naturales, sólo 1 reina de 200, que salen al vuelo nupcial, puede alcanzar un hormiguero maduro, las demás son víctimas de pájaros, reptiles, mamíferos, insectos, microorganismos, entomopatógenos, microparásitos y, especialmente, del hombre [Serna, 1999].

1.1.2 Taxonomía de *Atta laevigata*: En la **Tabla 1** se muestra la taxonomía de la HC y su nombre científico.

Tabla 1. Taxonomía de la hormiga “culona” y su nombre científico.

Clase	Insecta
Orden	Hymenoptera
Sub-orden	Apocrita
Familia	Formicidae
Sub-Familia	Myrmicinae
Tribu	Attini
Especie	<i>laevigata</i>
Género	<i>Atta</i>
Nombre científico	<i>Atta laevigata</i>

En Colombia se encuentran hasta el momento, cuatro especies del género *Atta*, a saber: *A. cephalotes*, *A. columbica*, *A. sexctens* y *A. laevigata* [Serna, 1999], siendo esta última, la especie más conocida y la de mayor interés económico para el departamento de Santander.

1.1.3 Morfología de *Atta laevigata*: La HC fue clasificada por F. Smith en 1858 como *Atta laevigata*. Este insecto de color pardo rojizo, presenta antenas acodadas con el primer segmento. Los dos primeros segmentos abdominales son delgados y con proyecciones o jorobas características en el dorso. Las formas aladas se parecen a las de avispas. Las larvas son blancas y degeneradas [Coronado, 1972].

1.1.4 Castas sociales de *Atta laevigata*: La HC es la punta de la pirámide de una perfecta organización social que existe en los hormigueros o colonias de estos insectos [Medina, 2003]. La colonia está conformada por las hormigas arquitectas, las corteras, las cargueras, las jardineras, los soldados, las nodrizas, los zánganos y las reinas aladas. Estas hormigas emergen cronológicamente de acuerdo con el orden expuesto anteriormente, y obedecen a la necesidad de sus funciones en la organización social de la colonia.

Los últimos en nacer son las reinas aladas y los zánganos, quienes son recluidos en “salas cuna” especiales, separados entre sí para impedir encuentros prematuros y con salidas independientes, las cuales les permiten conocerse el día del apareamiento, que es el único en su vida [Martínez, 1973].

1.1.5 Composición nutricional de *Atta laevigata*: La **Tabla 2** presenta la composición nutricional (%) de *Atta laevigata*.

Tabla 2. Composición nutricional de *Atta laevigata**

NUTRIENTE	CANTIDAD, %
Proteína	20
Agua	33
Grasas	33
Cenizas	10
Fibras y carbohidratos	4

Tomado de Martínez, V., 1973. En: Vida de las hormigas Culonas santandereanas.

1.1.6 Valor nutritivo de *Atta laevigata* comparada con otros alimentos: La **Tabla 3** presenta el valor nutritivo de la HC comparada con otros alimentos.

Tabla 3. Valor nutritivo de *Atta laevigata* comparado con otros alimentos*

NUTRIENTE	<i>Atta laevigata</i>	OTRAS CARNES
Proteína	20.40% g	Carne 21.5% g
Tiamina	1.1% mg	Carne 0.8% mg
Riboflavina	0.6% mg	Pollo 1.16% mg
Niacina	4.60% mg	Carne 5.1% mg

* Tomado de Martínez, V., 1973. En: Vida de las hormigas Culonas santandereanas.

1.1.7 Descripción del procesamiento de *Atta laevigata*: Después de su recolección manual en la boca de los hormigueros, las hormigas son envasadas en recipientes amplios, para que al ser transportadas vivas a los centros de acopio en las cabeceras municipales lleguen en las mejores condiciones de bienestar y con los mínimos niveles de estrés por causa de hacinamiento antes del sacrificio. Seguidamente, se someten a un proceso de eliminación de alas y patas, para posteriormente bañarlas con una solución de salmuera. De ahí y aún vivas son tostadas en recipientes de barro en forma de tuestos, a fuego vivo, cuidando que los aceites que segregan los cuerpos de las hormigas actúen como lubricantes naturales en su proceso de cocción [Quijano, 2003].

Figura 2 Fotografía de las hormigas *Atta laevigata*, después de ser sometidas al proceso de tostado.



1.1.8 Embalaje: En las ventas al detal, el producto se presenta en calabazos con contenidos aproximados de 100 g (**Figura 3**). Al por mayor, van empacados a granel en una bolsa preliminar de poli(propileno) sellada para preservarlas de invasión de elementos extraños, contagio de olores, etc. La bolsa se protege dentro de un costal de fique, para defenderla de variaciones de temperatura. Cada bolsa de fique tendría un contenido de 1000 g de hormigas, que, a su vez, irán contenidas en una caja de madera para su máxima protección, que será el embalaje final del producto [Quijano, 2003].

Figura 3. Embalajes más comunes de *Atta laevigata*, encontrados en el mercado.



1.1.9 Almacenamiento y conservación: Uno de los secretos del proceso de tostado es precisamente garantizar que los niveles de agua presentes en el cuerpo de la hormiga sean eliminados para que no representen un riesgo de fermentación o deterioro. Los aceites naturales segregados por las hormigas en su tostado, sumados a la salmuera con que se bañan antes de su cocción, permiten que se puedan conservar en estado óptimo por más de un año. Se deben almacenar a temperatura ambiente en recipientes de vidrio opaco debidamente sellados, para evitar procesos de oxidación [Quijano, 2003].

1.2 LÍPIDOS

No hay una definición de lípidos única, aceptada universalmente, aunque muchos químicos y bioquímicos, que trabajan con estos fascinantes productos naturales, tienen un entendimiento intuitivo del término [Christie, 1989]. La palabra “lípidos” proviene del griego “*lipos*” que significa grasa. Originalmente, se definía como una sustancia insoluble en agua, pero soluble en disolventes orgánicos, tales como cloroformo, acetona, benceno, éter de petróleo, hexano y etanol caliente [Badui, 1996; Bohinski, 1987]. Sin embargo, algunos autores contemplan como “lípidos” sólo aquellas moléculas que son derivados reales o potenciales de los FA's y/o sustancias relacionadas biosintéticamente. Según esta definición, los aceites y las grasas se consideran por antonomasia como lípidos y, más correctamente, como “lípidos simples” [Badui, 1996; Christie, 1989].

1.2.1 Clasificación: Existen diversos métodos para clasificar los lípidos, basados en alguna de las propiedades físicas o químicas que los caracteriza; cada uno con sus propias ventajas y desventajas, pero el más común consiste en dividirlos en tres grandes grupos, en función de su estructura química [Murray, 2001; Badui, 1996], tal como se muestra en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Clasificación de los lípidos según su estructura química.

-
- A. Lípidos simples. Ésteres de ácidos grasos y alcoholes.
1. Grasas y aceites. Ésteres de glicerol con ácidos monocarboxílicos;
 2. Ceras. Ésteres de alcoholes monohidroxilados y ácidos grasos.
- B. Lípidos compuestos. Lípidos simples conjugados con moléculas no lipídicas.
1. Fosfolípidos. Ésteres que contienen ácido fosfórico en lugar de ácido graso combinado con una base de nitrógeno;
 2. Glucolípidos. Compuestos de carbohidratos, ácidos grasos y esfingosinol;
 3. Lipoproteínas. Compuestos de lípidos y proteínas.
-

Continuación de la Tabla 4.

C. Compuestos asociados.

1. Ácidos grasos (derivados de lípidos simples);
 2. Pigmentos;
 3. Vitaminas liposolubles;
 4. Esteroles;
 5. Hidrocarburos.
-

*Tomado de Badui, S. En: Química de los Alimentos.

1.2.2 Función de los lípidos: Los lípidos son un grupo heterogéneo de sustancias indispensables para la salud humana y desempeñan diversas funciones en los seres vivos. Una de ellas, es la de servir como reserva energética del organismo, generando 9 kcal/g, a diferencia de las 4 kcal/g que se obtienen de los carbohidratos o las proteínas [Stryer, 1988; Karlson, 1965]. Este potencial energético está almacenado en las células adiposas (células grasas o adipositas), formando el tejido adiposo. Las células adiposas están especializadas para la síntesis y almacenamiento de TAG y para su movilización como moléculas combustibles, que son transportadas por la sangre a otros tejidos [Strayer, 1988]. Los lípidos actúan también como aislantes térmicos naturales en el hombre y en los animales, ya que por ser pobres conductores del calor, el tejido adiposo mantiene estable la temperatura del organismo [Enarváez, 2003; Badui, 1996].

La principal función de los lípidos, es la de formar parte de los componentes estructurales de las membranas; son imprescindibles para otras funciones, tales como la absorción de vitaminas liposolubles (A, D, E y K) [Madrid *et al.*, 1997], síntesis de hormonas y algunos órganos internos; actúan también como mensajeros químicos y están involucrados en el control del metabolismo [Gur y Harwood, 1991]. Aunque parezca paradójico, los lípidos representan también una importante reserva de agua, así la combustión de un mol del ácido palmítico puede producir hasta 146 moles de agua (32 por la combustión directa del

palmitato, el resto, por la fosforilación oxidativa acoplada a la respiración) [González, 2003]. Los lípidos tienen la propiedad única de contribuir a la textura y las propiedades sensoriales de los alimentos [Badui, 1996].

1.2.3 Extracción de lípidos: Varios procedimientos de extracción de lípidos, que están presentes en tejidos biológicos, son reportados en libros y artículos, con el fin de comparar, mejorar y agilizar el proceso de su recuperación. El propósito del proceso de extracción es separar los lípidos de otros constituyentes, tales como proteínas, polisacáridos y moléculas pequeñas (aminoácidos, azúcares, etc.), pero también conservar y proteger estos lípidos, para su posterior análisis [Cyberlipid, 2003].

Desde el primer trabajo, realizado por Michael Eugène en 1823, la mayoría de los métodos de extracción de lípidos involucran el uso de solventes, generalmente tóxicos e inflamables [Hamilton, 1992], tales como cloroformo, metanol o mezclas de éstos. Los métodos de extracción de Folch et al. [1957] y Bligh y Dyer [1959] que utilizaron esta mezcla de solventes, han sido ampliamente citados en la literatura y ensayados exhaustivamente por la comunidad científica. Equipos de extracción automáticos en modo semicontínuo, como el descrito por Fran von Soxhlet en 1939 [Cyberlipid, 2003], o de extracción continua tal como el extractor Goldfisch [Labconco, 2003], son aceptados e incluidos entre los métodos recomendados por la *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC). Otros métodos de extracción de lípidos involucran uso de fluido supercrítico [Anklam, 1998; Dionisi, 1999], asistencia de la radiación de microondas [García, 2002], sonicación [Cyberlipid, 2003], extracción con solvente acelerado [Dionex Corporation, 2000; Dionex Corporation, 1999] y microextracción en fase sólida (SPME) [Liu, 2002].

1.3 ÁCIDOS GRASOS

Las grasas y los aceites constituyen los lípidos más abundantes (98%) e importantes en alimentos de origen animal y/o vegetal. Ambos grupos están constituidos por TAG, los que, a su vez, son ésteres de FA`s con glicerol. El 2% restante son una mezcla de compuestos que incluyen hidrocarburos, tocoferoles, esteroides esterificados y libres [Choong, 1999].

1.3.1 Definición: Los FA`s se definen como ácidos monocarboxílicos de cadena alifática con número par (por regla general) de átomos de carbono en cada molécula, siendo los miembros de 12 a 22 átomos de carbono los más comunes [Badui, 1996; Hamilton, 1992]. Los FA`s son compuestos sintetizados en la naturaleza mediante condensación de unidades de malonil-Coenzima A, por el complejo del ácido graso-sintetasa [Christie, 1989]. En la actualidad, más de 1000 FA`s han sido identificados en tejidos de origen animal y vegetal, así como en ciertos microorganismos. Aún cuando son muchos, la mayoría de ellos se encuentran en concentraciones muy bajas [Gunstone, 1992].

1.3.2 Características estructurales de los ácidos grasos: Existen dos clases generales de FA`s en la naturaleza, a saber: los ácidos grasos saturados (SFA`s) y los ácidos grasos insaturados (UFA`s), los cuales se distinguen por las siguientes características estructurales [Lehninger, 1980; Hamilton y Hamilton, 1992]:

- ◆ Los FA`s son compuestos de cadena lineal con número par de átomos de carbono en cada molécula, con longitud de cadena entre 4 a 80 átomos de carbono,
- ◆ Los ácidos monoinsaturados contienen un enlace doble con configuración Z- (*cis*), que usualmente se encuentra en una posición específica de la cadena;
- ◆ Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA`s) contienen dos o más enlaces dobles

con configuración Z-(*cis*), separados por un grupo metileno;

♦ Los FA's menos comunes contienen un número impar de átomos de carbono, enlaces acetilénicos, grupos epoxi-, hidroxil-, anillos ciclopropano y ciclopentano.

1.3.3 Ácidos grasos saturados: Este tipo de FA's se encuentran presentes por lo general en grasas de origen animal, no presentan enlaces dobles en su estructura y se caracterizan por ser sólidos o semi-sólidos a temperatura ambiente.

Los SFA's más comunes se muestran en la **Tabla 5**, encontrándose generalmente esterificados, integrando los TAG; cuando llegan a estar en estado libre, es porque probablemente sufrieron hidrólisis del enlace éster [Badui, 1996].

La nomenclatura sistemática usada más frecuentemente para nombrar un SFA's está basada en poner al nombre del FA el nombre del hidrocarburo del mismo número de carbonos, sustituyendo la *o* final por *oico* (sistema ginegrino), aunque la mayoría son conocidos por nombres comunes. También se pueden escribir de forma abreviada de la siguiente forma: C_n:_x, donde "n" es el número de átomos de carbono en la cadena, y "x" indica la saturación de la misma (x=0) [Murray, 2001].

Tabla 5. Ácidos grasos saturados más comunes en fuentes naturales.

Nombre común	Nombre científico	Abreviatura
Láurico	Dodecanoico	C12:0
Mirístico	Tetradecanoico	C14:0
Palmítico	Hexadecanoico	C16:0
Esteárico	Octadecanoico	C18:0
Araquídico	Eicosanoico	C20:0

*Tomado de Badui, S. En: Química de los Alimentos.

1.3.4 Ácidos grasos monoinsaturados: Este tipo de FA's está presente en grasas de origen animal y vegetal; los FA's monoinsaturados se caracterizan por ser líquidos a temperatura ambiente. Varios convencionalismos son usados para

indicar la posición del doble enlace, siendo el símbolo omega “ ω x” el más utilizado, donde “x” es el átomo de carbono que contiene la insaturación contando desde el átomo de carbono omega (último carbono de la cadena carbonada). Los FA’s monoinsaturados de importancia nutricional se presentan en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Ácidos grasos monoinsaturados de importancia fisiológica y nutricional*

Nombre común	Nombre científico	Serie	Abreviatura
Miristoléico	9-Tetradecenoico**	ω 5	C14:1;5
Palmitoléico	9-Hexadecanoico	ω 7	C16:1;9
Oléico	9-Octadecanoico	ω 9	C18:1;9
Nervónico	15-Tetracosanoico	ω 9	C24:1;15

*Tomado de Christie, W. En: Gas Chromatography and Lipids. A Practical Guide.

** La configuración del enlace doble en cada caso es *cis* (Z-).

1.3.5 Ácidos grasos poliinsaturados: Este tipo de FA’s es abundante en aceites vegetales y marinos; los PUFA’s, más importantes se caracterizan por la presencia de dos o más enlaces dobles con configuración Z-(*cis*). Los PUFA’s de importancia fisiológica y nutricional se muestran en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Ácidos grasos poliinsaturados de importancia fisiológica y nutricional.*

Nombre común	Nombre científico	Serie	Abreviatura
Linoleico	9,12-Octadecadienoico**	ω 6	C18:2;9,12
γ -Linolénico	6,9,12-Octadecatrienoico	ω 6	C18:3;6,9,12
α -Linolénico	9,12,15-Octadecatrienoico	ω 3	C18:3;9,12,15
<i>homo</i> - γ -Linolénico	8,11,14-Eicosatrienoico	ω 6	C20:3;8,11,14
Araquidónico	5,8,11,14-Eicosotetraenoico	ω 6	C20:4;5,8,11,14

*Tomado de Christie, W. En: Gas Chromatography and Lipids. A Practical Guide.

** La configuración del enlace doble en cada caso es *cis* (Z-).

1.3.6 Importancia nutricional de los ácidos grasos: Los FA’s tienen gran importancia en la nutrición, ya que son la principal fuente de almacenamiento de

energía (9 kcal/g) cuando se encuentran en forma esterificada [Karlson, 1965]. Además, la ingesta de grasas durante el primer año de vida es fundamental como fuente de EFA`s y como vehículo de vitaminas liposolubles, cuya absorción favorecen [Ronayne, 2000]. Los EFA`s (ácidos linoleico y α -linolénico) son necesarios para un crecimiento y desarrollo normales. Por lo tanto, deben ser incluidos en la dieta del individuo ya que el organismo no los puede sintetizar y su carencia da lugar a ciertas manifestaciones clínicas [Elvevoll y James, 2000; Innis, 1993]. Los EFA`s de las familias ω -3 y ω -6, desempeñan rol crítico en la estructura de la membrana, intervienen en la agregación plaquetaria, en procesos inflamatorios y en el sistema inmunológico [Delfino y Sarno, 1999]. Son indispensables para mantener la piel saludable, suave y flexible [Toussaint, 2003], y forman parte de la estructura de las neuronas, cerebro, retina y de nervios periféricos [Minich, 1999].

1.3.7 Fuentes naturales de ácidos grasos: Uno de los principales nutrientes presente en los alimentos son las grasas. Este tipo de sustancias están constituidos por TAG, los que, a su vez, son ésteres de FA`s con glicerol. Los FA`s están ampliamente distribuidos en la naturaleza, siendo sus principales fuentes de origen animal, vegetal y marina (ver **Tabla 8**).

Tabla 8. Fuentes naturales más comunes de ácidos grasos.

A. Fuentes vegetales (principalmente UFA`s)	Principales FA`s	% FA`s en el aceite
Soya	Linoleico (C18:2)	50
Girasol	Linoleico (C18:2)	50
Colza	Oleico (C18:1)	60
Palma	Palmítico (C16:0)	50
	Oleico (C18:1)	40
Coco	Laúrico (C12:0)	55

Continuación de la **Tabla 8.**

B. Fuentes animales		Principales ácidos grasos (%)				
(Principalmente SFA`s)	14:0	16:0	18:0	16:1	18:1	18:2
Sebo	4	30	17	5	42	2
Grasa de:						
Oveja	-	24	18	4	47	4
Cerdo	1	28	12	3	46	10
Ave	-	25	5	6	32	32
C. Fuentes marinas		Principales ácidos grasos				
(Principalmente PUFA`s)	FA`s de cadenas carbonadas poliinsaturadas (más del 10% exceden los 20 átomos de carbono).					

Tomado de Wiseman, J. En: Assigning energy values to ingredients for pigs.

Las grasas de origen animal son ricas en grasas saturadas, especialmente aquellas provenientes de mamíferos como el cerdo, la oveja, el pollo y la vaca. Las grasas provenientes de otros grupos de animales, como peces, contienen ácidos grasos poliinsaturados. Los aceites vegetales, provenientes de semillas como el maíz, el girasol y la soya, tienen un alto contenido de EFA`s y PUFA`s por ello es importante y conveniente que formen parte de la dieta [Jatar, 2000].

1.3.8 Análisis de ácidos grasos mediante cromatografía de gases: GC ha jugado un papel importante en el análisis de todas las clases de lípidos encontrados en fuentes naturales, tanto de origen vegetal como animal [Evershed, 1992], con la excepción de algunos compuestos isoprenoides de alto peso molecular (por ejemplo, carotenoides). GC es sin duda la herramienta principal con que cuenta un químico para analizar FA`s en alimentos. Desde la primera separación realizada por James y Martin en 1952, hasta nuestros días, GC ha revolucionado el estudio de los lípidos porque ha hecho posible la determinación completa de FA`s, en tiempos de análisis muy cortos [Christie, 1989]. Se han realizado algunas mejoras para el análisis de FA`s debido a su polaridad,

reactividad alta y muy baja volatilidad. Los FA`s son generalmente convertidos a sus ésteres metílicos correspondientes [Christie, 1999], aunque se pueden utilizar otros ésteres para propósitos específicos (ver **Tabla 9**), antes del análisis cromatográfico, para aumentar la volatilidad, mejorar la forma de los picos y lograr, por ende, una resolución más alta de los respectivos derivados de FA`s [Liu, 1994].

Tabla 9. Ésteres de ácidos grasos más utilizados en el análisis por GC.

Derivado éster	Referencias
Metilo	Rueda <i>et al.</i> 2003; Carrapiso, 2000; Fuentes,1999; Moreno y Duran, 1999; Christie, 1993
Etilo	Destailats <i>et al.</i> , 2002
Isopropilo	Chardigny,1995; Peuchant <i>et al.</i> ,1989
n-Propilo	Destailats <i>et al.</i> , 2002
n-Butilo	Destailats <i>et al.</i> 2002; Iverson y Sheppard, 1977
Metoxietilo	Destailats <i>et al.</i> , 2002
Picolinilo	Harvey, 1982
3-Oxabutilo	Destailats <i>et al.</i> , 2002
Trimetilsililo y <i>tert</i> -Butildimetilsililo	Evershed,1993; Hamilton 1992
3-Hidroxipropilpiridinilo	Destailats <i>et al.</i> , 2002

El análisis de los FAME`s puede realizarse en columnas capilares apolares, poli(dimetilsiloxano), columnas altamente polares (siliconas cianosustituidas) o en columnas polares, poli(etilenglicol) [Supelco, 1997]; siendo éstas últimas las más utilizadas. Los correspondientes FAME`s eluyen en orden creciente de su longitud y grado de insaturación, en columnas polares. El detector de ionización en llama (FID), es el sistema de detección más utilizado para registrar FAME`s, y comparar sus t_R con los de estándares certificados disponibles comercialmente (de Matreya, Sigma, Un-Chekprep, Larodan...) [Carrapiso, 2000; Wang, 2000]. También se han

utilizado métodos matemáticos para predecir los t_R de FA`s de cadena ramificada en mezclas biológicas complejas [Torres, 2002]. Con el objeto de elucidar las estructuras, detectar y cuantificar FA`s a nivel de trazas, como métodos confirmatorios, se utilizan cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) [Rueda, 2003; Fuentes, 1999; Moreno, 1999], resonancia magnética nuclear (^1H , ^{13}C NMR) [Gunstone, 1993; Wada, 2001] y espectroscopía infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) [Firestone y Shepard, 1992].

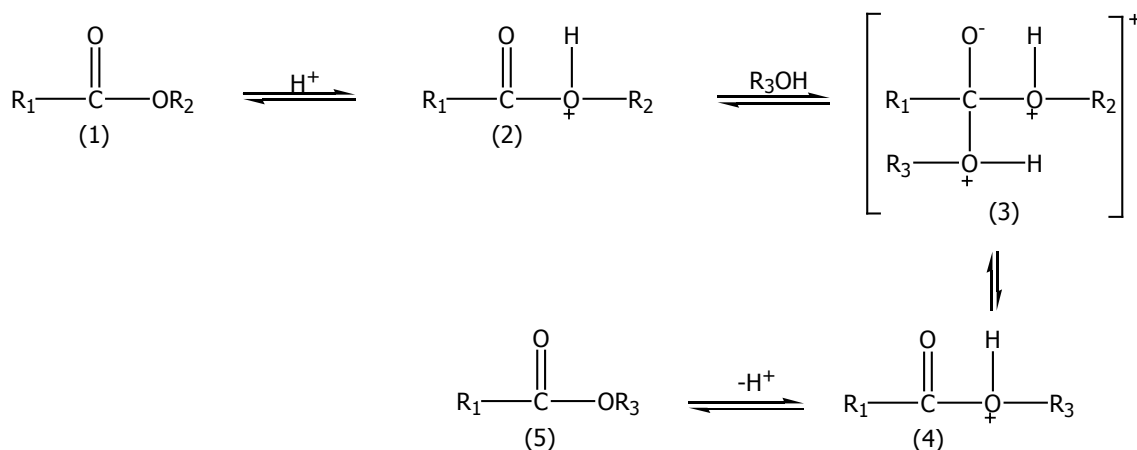
1.3.9 Derivación de ácidos grasos: En muchos casos la determinación de analitos de interés es desarrollada sobre moléculas intactas; sin embargo para sustancias no volátiles, termoinestables y reactivas como los FA`s, se requiere de derivación previa, antes del análisis cromatográfico [Christie, 1993]. Los derivados más comunes de los FA`s son los ésteres metílicos, los cuales se pueden obtener en condiciones ácidas o alcalinas sobre los lípidos aislados o sobre los FA`s libres [Hamilton, 1992], pero pueden también obtenerse directamente sobre la muestra en una sola etapa, combinando la etapa de extracción y transesterificación de los lípidos. Los FAME`s se obtienen también empleando diazometano [Carrapiso *et al.* 2000; Vorbeck *et al.* 1961], hidróxido de tetrametil amonio [Beverly, 1997], sales de tetrametil amonio u otros catalizadores.

- **Transesterificación catalizada por ácidos:** Los FA`s, constituyentes de TAG pueden ser transesterificados por un alcohol en presencia de un catalizador ácido conveniente, tal como se ilustra en el **Esquema 1** [Christie, 1993].

En la transesterificación catalizada por ácidos, primero ocurre la protonación del lípido y luego, por la adición de un alcohol, se origina el intermediario (3), el cual se puede disociar a través de un estado de transición (4), produciendo el éster (5).

Las condiciones preferidas para la reacción de transesterificación son exceso de alcohol y ausencia de agua. Las condiciones libres de agua se alcanzan por adición de sulfato de sodio anhidro o 2,2-dimetoxipropano al medio de reacción [Christie, 1993].

Esquema 1. Transesterificación de lípidos catalizada por ácidos.



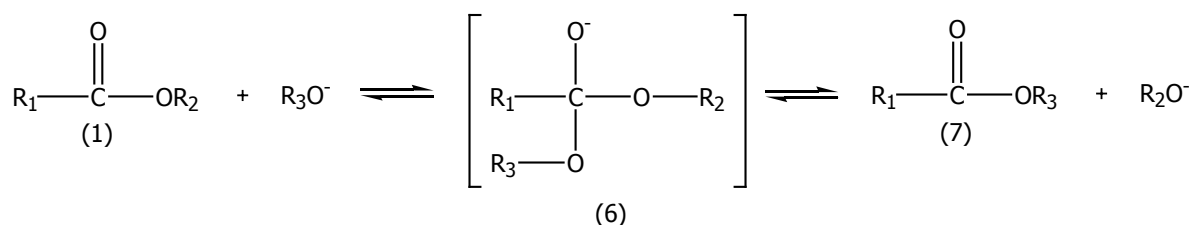
Metcalfe y Schmitz [1961] determinaron que BF_3 , un ácido de Lewis, al 14% en metanol era un reactivo conveniente para metilar FA's libres. En 1969, este resultado fue aceptado por la *Association of Official Analytical Chemists* [AOAC, 1969] y en 1979 por la *International Union of Pure and Applied Chemistry* [IUPAC, 1979], como método oficial. La principal ventaja de este reactivo es su fácil disponibilidad comercial, aunque es un reactivo tóxico, relativamente inestable en almacenamiento, puesto que puede formar artefactos, si el reactivo está longevo [Shepherd, 1975]. AlCl_3 , otro ácido de Lewis, resulta tan efectivo como BF_3 [Segura, 1988].

Otro catalizador ácido, considerado por los científicos como el mejor reactivo para catalizar la reacción de transesterificación, es el HCl en metanol al 5% [Christie, 1989]. Hitchcock y Hammond [1980] afirman que H_2SO_4 al 2% en metanol, es

buen reactivo para metilar FA's, éste fue aprobado en 1966 por el *Instrumental Committee of The American Oil Chemist's Society*.

- **Transesterificación de lípidos catalizada por bases:** Los lípidos pueden ser transesterificados por medio de un anión alcoholato, tal como se ilustra a continuación [Christie, 1993]:

Esquema 2. Transesterificación de lípidos catalizada por bases.



En la transesterificación catalizada por bases (Ver **Esquema 2**), el éster (1) en presencia de una base como el anión alcoholato (R_3O^-) forma un intermediario aniónico (6), que puede disociarse para formar el éster de partida (1) o uno nuevo (7).

La transesterificación catalizada por bases fue usada antes que el reactivo BF_3 en metanol, por James y Martin en 1956. Sin embargo, el metóxido de sodio no fue reconocido sino hasta 1978 por la *International Organization for Standardization* [ISO, 1978], como método oficial. Este reactivo es muy efectivo para interesterificar TAG, glicosil digliceridos, fosfolípidos a temperatura ambiente, en tan solo 5-10 min. Este reactivo no puede ser usado para metilar FA's libres y ésteres de colesterilo (Bannon, 1982). Al igual que en los catalizadores ácidos, las mejores condiciones de reacción son cantidades grandes del alcohol, para producir el nuevo éster y ausencia de agua en el medio de reacción, la cual puede disociar irreversiblemente el intermediario al ácido libre.

1.4 TRANSESTERIFICACIÓN *in situ* (ISTE)

ISTE ha sido el centro de atención durante las últimas décadas como método alternativo para analizar FA`s. El concepto de transesterificación *in situ* fue propuesto por Abel *et al.* en 1963, y es usado actualmente para el análisis de pequeñas muestras de tejido (1-10 mg) o pequeños volúmenes (aproximadamente 50 μ L) de fluidos biológicos (Cyberlipid, 2003). Mediante este método, la etapa de extracción de lípidos, requerida en métodos convencionales, es eliminada; por ende, el análisis de FA`s se hace más rápido y es menos costoso. Muchos estudios (Rueda, 2003; López-López, 2001; De la Cruz, 2000; Cantellops, 1999, Park y Goins, 1994) muestran que ISTE frecuentemente proporciona resultados similares o mejores cuando se compara con métodos convencionales, los cuales involucran extracción previa de la grasa, seguida de transesterificación. El contenido de grasa puede ser estimado de acuerdo con su definición, según la NLEA [Federal Register, 1993].

Sin embargo, es necesario mencionar algunos inconvenientes del proceso ISTE para el análisis de FA`s, a saber: 1. Baja solubilidad de los lípidos en $\text{BF}_3/\text{CH}_3\text{OH}$; por tal motivo, se hace necesaria la adición de solventes orgánicos tales como cloruro de metileno (Iverson *et al.*, 1992; Park y Goins, 1994), tolueno (Ulberth y Henniger, 1992) o tetrahidrofurano (Christie, 1992), aconsejables para adquirir reacciones rápidas y completas y 2. Bajos rendimientos en el proceso de transesterificación debido a la presencia de agua u otros compuestos que producen interferencias (Carrapiso, 2000).

2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

2.1 REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS DE LABORATORIO

Los reactivos y solventes, utilizados en esta investigación, fueron grado analítico. Las casas productoras y el grado de pureza de reactivos y solventes se resumen en la **Tabla 10**. Los reactivos y solventes utilizados en la parte experimental del presente estudio, destinados a la preparación de patrones, extracción del material lipídico, presente en las muestras de la HC, y en la obtención de los FAME's fueron grado HPLC y grado analítico.

Tabla 10. Sustancias químicas, empleadas en este proyecto.

REACTIVOS	PUREZA Y CASA PRODUCTORA
Mezcla certificada de FAME's (GLC-10, GLC-50, GLC-70, GLC-80, GLC-100)	99.8%, Matreya, Inc., Pennsylvania, EE.UU.
Complejo de trifluoruro de boro en metanol (BF ₃ /CH ₃ OH)	14%, Merck, Hohenbrunn, Alemania.
<i>n</i> -tetradecano (sustancia de referencia para GC)	99.5%, Merck, Darmstadt, Alemania.
Patrón certificado de triestearina	99%, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania.
Cloruro de metileno	99.9%, Mallinckrodt Baker, Inc., Paris, Francia.
Cloruro de sodio	99.5%, Merck, Darmstadt, Alemania.
<i>n</i> -Hexano	99.9 %, Mallinckrodt Baker, Inc., Paris, Francia.
Hidróxido de sodio	99.5%, Carlo Erba, Milán, Italia.
Metanol	99.8%, Riedel-de Haën, Seelze, Alemania.

A continuación se describen los materiales y equipos, utilizados en este proyecto:

Materiales:

- ◆ Tubos de ensayo tapa rosca de 16 x 150 mm (Kimax);
- ◆ Tubos cónicos de poli(propileno) de 1.5 mL (BRAND, Postfach 1155. D-97864 Wertheim, Alemania);
- ◆ Pipetas Pasteur en vidrio de 230 mm de longitud (BRAND, Postfach 1155. D-97861 Wertheim, Alemania);
- ◆ Balones aforados de 5, 10, 50 mL (Kimax);
- ◆ Micropipeteadores de 2-20, 25-250 y 100-1000 μ L (BRAND, Postfach 1155. D-97864 Wertheim, Alemania);
- ◆ Agitadores magnéticos recubiertos de teflón;
- ◆ Consumibles cromatográficos (*septa*, *férrulas*, *liners*, frascos de 1.5 mL para GC, jeringas Hamilton de 10 μ L, otros);
- ◆ Gas especial (He, Aga FANO, S.A., Bucaramanga, Colombia);

Equipos menores:

- ◆ Plancha de calentamiento con agitación magnética (SCHOTT MR 1065, Schott-Geräte GmbH, D-65719 Hofheim /Ts, Alemania);
- ◆ *Minishaker* (SCHOTT MR 1065, Schott-Geräte GmbH, D-65719 Hofheim /Ts, Alemania);
- ◆ Balanza digital (BA310S Startius Basic, \pm 0.005 g, Alemania);
- ◆ Balanza analítica (AG285 METTLER TOLEDO, \pm 0.00001 g, Suiza).

2.2 MUESTRAS

2.2.1 Recolección de las muestras: Las muestras de hormigas (HC) vivas, fueron adquiridas directamente de la boca de un hormiguero localizado en la vereda el Pantano (municipio de Girón), de forma manual. Las HC fueron

transportadas en un recipiente de poli(propileno) lo suficientemente grande (de 5 L de capacidad), para evitar condiciones de estrés antes de ser preparadas. Las hormigas se prepararon de acuerdo con la metodología recomendada por Quijano [Quijano, 2003]. Los aceites comerciales de origen vegetal (girasol; oliva; soya; semilla de cedro y oleina de Palma) fueron adquiridos en un supermercado local (Ley Cabecera).

2.2.2 Taxonomía de *Atta laevigata*: La taxonomía de las HC, empleadas en este estudio, fue determinada en el Laboratorio de Entomología de la Universidad Industrial de Santander, por el entomólogo Alfonso Villalobos Moreno M.Sc., Universidad Nacional de Colombia. La HC fue clasificada de la siguiente manera:

Clase	Insecta
Orden	Hymenoptera
Sub-orden	Apocrita
Familia	Formicidae
Sub-Familia	Myrmicinae
Tribu	Attini
Especie	<i>laevigata</i>
Género	<i>Atta</i>
Nombre científico	<i>Atta laevigata</i>

2.2.3 Preparación de las muestras: Las muestras de las HC se prepararon de la siguiente manera:

A las muestras de las HC se les eliminaron las patas y alas. Posteriormente, las HC fueron bañadas en una solución salina de cloruro de sodio (sal de cocina). Finalmente, fueron tostadas a fuego lento, en un tiesto de barro. Una vez preparadas, las hormigas se guardaron en frascos de vidrio tapa rosca color ámbar a -4 °C, hasta su respectivo análisis.

2.2.4 Tratamiento de las muestras: Se tomó una muestra de las HC (aproximadamente 30 g), se pasó varias veces por un triturador eléctrico hasta conseguir una mezcla homogénea. Las muestras, bien homogeneizadas, se guardaron para evitar la degradación oxidativa, en frasco de vidrio color ámbar de 100 mL de capacidad, bajo atmósfera de nitrógeno y refrigeración (-4 °C), para su posterior análisis.

2.3 EXTRACCIÓN, IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS

2.3.1 Extracción de grasa: La extracción de grasa de la HC se llevó a cabo empleando el método convencional de extracción de grasa propuesto por Folch *et al.* (1957) de la siguiente manera:

En un vial tapa rosca de 100 mL de capacidad se pesaron aproximadamente 2 g de hormigas, previamente homogeneizadas, que se sometieron a extracción con solvente asistida por ultrasonido, por un período de tiempo de 15 min (dos veces). Se utilizaron 40 mL de una mezcla cloroformo:metanol 2:1 (v/v). Después de la extracción con solvente, los extractos colectados se lavaron con 10 mL de una solución salina al 0.88 %. El extracto resultante se concentró en un rotaevaporador, hasta obtener el material lipídico, libre de solvente, el cual se colocó en una caja Petri, para pesar y determinar el porcentaje de grasa presente en la muestra. El contenido de grasa se expresó en mg de grasa en 100 mg de muestra.

2.3.2 Conversión de ácidos grasos a sus ésteres metílicos: El análisis de FA's se llevó a cabo mediante la obtención de sus ésteres metílicos, según la Norma ISO 5509 (*Animal and Vegetable Fats and Oils – Preparation of Methyl Esters of Fatty Acids*), de la siguiente manera:

Aproximadamente 60 mg del material lipídico de la HC (previamente extraído) o del aceite vegetal bajo estudio, se colocaron en un tubo de ensayo con tapa rosca (16 x150 mm); seguidamente, se adicionaron 5 mL del complejo de trifluoruro de boro al 14% en metanol. La mezcla, con agitación, se sumergió en un baño de aceite a 85-90 °C durante 45 min, tiempo, que fue establecido previamente, mediante la transesterificación de un patrón de triestearina (99%, Sigma-Aldrich, Alemania), a diferentes intervalos de tiempo de calentamiento. Posteriormente, la muestra fue retirada del baño de aceite y se dejó reposar durante 5 minutos. Finalmente, se realizó la extracción de los FAME`s con 3 x 1 mL de *n*-hexano. Del extracto orgánico se tomaron 0.5 mL, se adicionaron 0.5 µL de *n*-tetradecano, se aforó la mezcla a 1 mL con el mismo solvente y 2 µL de la solución fueron inyectados al cromatógrafo de gases, para su respectivo análisis.

En la **Figura 4**, se puede observar el dispositivo empleado para llevar a cabo las reacciones de transesterificación de las diferentes muestras analizadas en este proyecto.

Figura 4. Dispositivo utilizado para llevar a cabo las reacciones de transesterificación.



2.3.3 Identificación de ácidos grasos: La identificación de los FA`s en las muestras se realizó por comparación de los t_R de sus ésteres metílicos, con los de una mezcla certificada de FAME`s GLC10, GLC50, GLC70, GLC80 y GLC100, adquirida de Matreya, Inc., Pennsylvania, EE.UU. Los patrones se analizaron bajo las mismas condiciones cromatográficas que las muestras. La identificación de los FA`s fue confirmada mediante sus espectros de masas.

2.3.4 Cuantificación de ácidos grasos: La cuantificación relativa (%) promedio de los FA`s, en forma de sus FAME`s, se realizó empleando el método de normalización interna, según la norma ISO 5508 (*Animal and Vegetable Fats and oil – Analysis by GC of Methyl Esters of Fatty Acids*). La siguiente fórmula fue aplicada para calcular el contenido de un FA dado (i) (expresado como porcentaje en masa de éster metílico), mediante la determinación del porcentaje que representa el área de su pico en relación con la suma de todos los picos:

$$\% \text{FA} = \frac{A_i}{\sum A} * 100$$

Donde:

A_i : Área del pico correspondiente al componente i.

$\sum A$: Suma de las áreas de todos los picos.

También se llevó a cabo la cuantificación de los FA`s en las HC (mg FA / 100 mg de HC), empleando la técnica de estandarización interna, donde se utilizó el *n*-tetradecano (sustancia de referencia para GC) como patrón interno. Las áreas de los picos cromatográficos de cada uno de los FA`s presentes en las muestras bajo análisis, se compararon con el área reportada para el patrón interno. Asumiendo que los factores de respuesta del detector para el patrón interno (R_f) y para los

FA`s de la muestra son similares, las concentraciones de cada uno de los componentes se calcularon con base en las siguientes ecuaciones:

$$C_x = C_i * \frac{V_e}{W} * 100$$

Donde:

$$C_i = C_A * \frac{A_x}{A_A}$$

C_x : Concentración de ácido graso en la muestra (mg de ácido graso/100mg muestra) ;

W : Peso de HC transesterificada (mg).

C_i : Concentración de ácido graso en el extracto final (mg/mL);

V_e : Volumen de solvente de extracción (3mL);

C_A : Concentración del patrón interno en el extracto (mg/mL)

A_x : Área del compuesto de interés (cuentas).

A_A : Área del patrón interno (cuentas).

2.4. PARÁMETROS ANALÍTICOS

El análisis cromatográfico de los FA`s, presentes en las muestras bajo estudio, se realizó en un cromatógrafo de gases *Agilent Technologies 6890 Plus* (ver **Figura 5**), equipado con un detector selectivo de masas (MSD) *Agilent Technologies 5973N* y un inyector automático HP-7683; la inyección fue realizada en el modo *split* (1:30). Los datos fueron procesados a través de un sistema de datos HP ChemStation 1.05, equipado con las bases de datos de espectros de masas NBS75K y Wiley 138K. Se usó una columna capilar de sílice fundida DB-5MS (J&W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.) de 60 m x 25 mm (D.I.), recubierta con una

fase estacionaria de 5%-fenil poli(metilsiloxano) de 0.25 μm de espesor. Como gas de arrastre se empleó helio (99.995 %, Aga Fano S.A), con un flujo de 1 mL/min.

Figura 5. Cromatógrafo de gases *Agilent Technologies* HP 6890 *Plus*, equipado con un detector selectivo de masas *Agilent Technologies* 5973 N.



2.5 ESTUDIO DE LA REPRODUCIBILIDAD DE LOS t_R , t_{RR} , Y ÁREAS DE PICOS DE LOS FAME`s

Se inyectó por triplicado al cromatógrafo de gases bajo las condiciones descritas en la Sección 2.4, una solución patrón de FAME`s. Se realizó el estudio estadístico de la reproducibilidad de los t_R , t_{RR} , y áreas de los picos. Para cada parámetro, se determinó su coeficiente de variación. Las siguientes fueron ecuaciones empleadas de los valores promedio (\bar{X}), desviación estándar (σ) y coeficientes de variación (CV, %):

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n} \quad \sigma = \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{(n-1)}} \quad \% CV = \frac{\sigma}{\bar{X}} \times 100\%$$

Donde:

\bar{X} : Valor promedio de la variable X (t_R o t_{RR});

X_i : Valor "iésimo", obtenido para la variable X en una medición;

n: Número de mediciones;

σ : Desviación estándar;

CV: Coeficiente de variación (%).

2.6 TRANSESTERIFICACIÓN *in situ*

Se utilizó la metodología (ISTE), propuesta por Park y Goins [1994], para obtener FAME`s de forma directa, sin previa extracción de la grasa. El método ISTE se llevó a cabo de la siguiente manera:

La muestra (aproximadamente, 100 mg) de la HC previamente homogeneizada, se colocó en un tubo de ensayo con tapa rosca (16 x 150 mm). Seguidamente, se adicionaron 500 μ L de cloruro de metileno y 1 mL NaOH/metanol 0.5N. Una corriente de nitrógeno se usó para purgar el espacio de cabeza del tubo, para evitar procesos de oxidación. La mezcla, con agitación, se sumergió en un baño de aceite a 85 ± 5 °C durante 20 minutos. Posteriormente, la muestra fue retirada del baño de aceite y se dejó reposar durante 5 minutos. Seguidamente, se adicionó 1 mL de agente derivatizante a la masa de reacción, se purgó nuevamente con nitrógeno y se continuó luego así, como se describe en la Sección 2.3.2.

3. ANÁLISIS DE RESULTADOS

3.1 REPRODUCIBILIDAD DE LOS PARÁMETROS CROMATOGRÁFICOS

3.1.1 Tiempos de retención (t_R): En la **Tabla 11** se reportan los valores de t_R obtenidos para los FAME`s de la mezcla certificada, empleada para realizar la identificación de los FA`s en las muestras de HC, analizadas en este proyecto. En dicha tabla se reporta el estudio estadístico para los mismos: promedios, desviaciones estándar y coeficientes de variación (%). Los valores de tiempos de retención se reportan como el valor promedio \pm desviación estándar.

Tabla 11. Estudio de la reproducibilidad de los tiempos de retención (t_R) de ésteres metílicos de ácidos grasos.

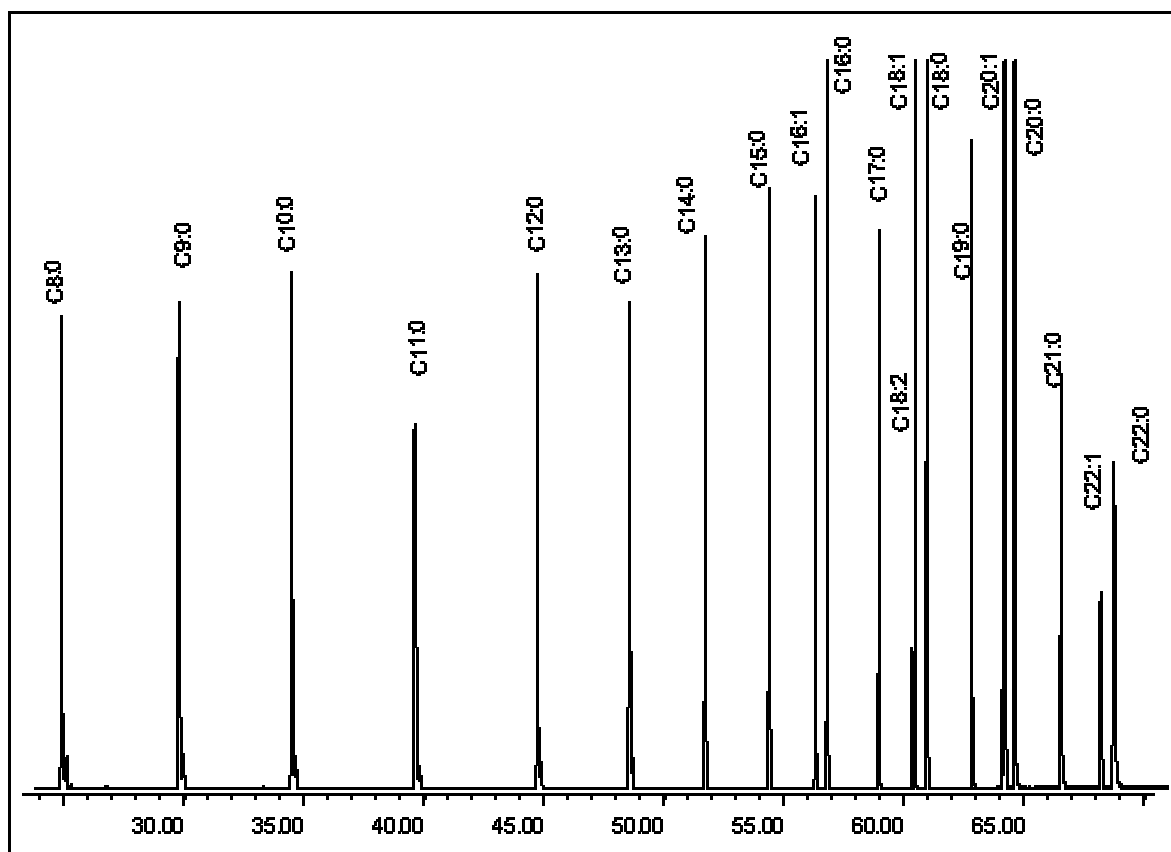
Pico N°	Fórmula	Éster metílico del ácido:	t_R , min*	CV, %
1	C8:0	Caprílico	24.378 \pm 0.000	0.00
2	C9:0	Nonanoico	29.270 \pm 0.003	0.03
3	C10:0	Cáprico	33.960 \pm 0.006	0.05
5	C11:0	Undecanoico	37.83 \pm 0.02	0.06
6	C12:0	Láurico	39.10 \pm 0.01	0.06
7	C13:0	Tridecanoico	44.20 \pm 0.02	0.08
8	C14:0	Mirístico	48.05 \pm 0.02	0.07
9	C15:0	Pentadecanoico	51.20 \pm 0.02	0.06
10	C16:1	Palmitoléico	53.89 \pm 0.02	0.05
11	C16:0	Palmítico	55.80 \pm 0.01	0.04
12	C17:0	Heptadecanoico	56.26 \pm 0.01	0.04
13	C18:2	Linoleico	58.43 \pm 0.01	0.04
14	C18:1	Oleico	59.82 \pm 0.02	0.03
15	C18:0	Esteárico	59.940 \pm 0.009	0.02
16	C19:0	Nonadecanoico	60.42 \pm 0.01	0.05
17	C20:2	Eicosadienoico	62.30 \pm 0.01	0.02
18	C20:1	Eicosenoico	63.56 \pm 0.01	0.03
19	C20:0	Araquídico	63.650 \pm 0.008	0.02
20	C21:0	Heneicosanoico	64.090 \pm 0.008	0.02
21	C22:1	Erúcico	66.020 \pm 0.004	0.01
22	C22:0	Behénico	67.690 \pm 0.001	0.002

Valor promedio (n=3)

Como puede apreciarse en la **Tabla 11**, los coeficientes de variación para todos los FA's en forma de sus ésteres metílicos, estuvieron por debajo de 0.08 %. Estos valores no sobrepasaron el valor máximo permitido por las Buenas Prácticas de Laboratorio, que establecen un valor máximo de 2%, lo que indica una alta reproducibilidad en el sistema de inyección y, por ende, una confiabilidad en la identificación de los FA's en las muestras, al emplear el método de comparación de tiempos de retención.

En la **Figura 6**, se muestra el cromatograma típico, obtenido por GC-MS, de la mezcla certificada de FAME's empleada en este proyecto.

Figura 6. Cromatograma típico obtenido de la mezcla certificada de ésteres metílicos de ácidos grasos.



3.1.2 Tiempos de retención relativos (t_{RR}): En la **Tabla 12** se reportan los valores de tiempos de retención relativos (t_{RR}) obtenidos para la mezcla certificada de FAME`s. Un patrón certificado de *n*-tetradecano (sustancia de referencia para GC) se utilizó como estándar interno (ISTD)¹.

Tabla 12. Estudio de la reproducibilidad de los tiempos de retención relativos (t_{RR}) de la mezcla certificada de FAME`s corridos en una columna DB-5MS.

FA`s	t_R , min*	t_{RR}	σ		CV, %	
			t_R	t_{RR}	t_R	t_{RR}
C8:0	24.370	0.49	0.002	5 E-06	0.01	0.01
C9:0	29.270	0.66	0.003	1 E-04	0.03	0.02
C10:0	33.960	0.88	0.006	3 E-04	0.05	0.04
C11:0	39.10	1.16	0.01	6 E-04	0.06	0.05
C12:0	44.20	1.47	0.02	1 E-03	0.06	0.08
C13:0	48.05	1.76	0.02	1 E-03	0.08	0.06
C14:0	51.20	1.97	0.02	1 E-03	0.07	0.05
C15:0	53.89	2.14	0.02	8 E-04	0.06	0.04
C16:1	55.80	2.30	0.01	6 E-04	0.05	0.03
C16:0	56.26	2.27	0.01	7 E-04	0.04	0.03
C17:0	58.43	2.39	0.01	7 E-04	0.04	0.03
C18:2	59.82	2.52	0.02	1 E-03	0.04	0.04
C18:1	59.940	2.51	0.009	4 E-04	0.03	0.02
C18:0	60.42	2.50	0.01	4 E-04	0.02	0.02
C19:0	62.30	2.59	0.01	4 E-04	0.05	0.02
C20:2	63.56	2.68	0.01	8 E-04	0.02	0.01
C20:1	63.650	2.70	0.008	3 E-04	0.03	0.01
C20:0	64.090	2.69	0.008	3 E-04	0.02	0.01
C21:0	66.020	2.78	0.004	2 E-05	0.02	0.01
C22:1	67.690	2.91	0.001	2 E-04	0.01	0.01
C22:0	68.240	2.89	0.002	1.3E-04	0.01	0.01

* Valor promedio (n=3)

Como se muestra en la **Tabla 12**, el análisis estadístico obtenido para los t_{RR} de la mezcla certificada de FAME`s presentó desviaciones estándar (σ) y coeficientes de variación (CV, %) inferiores a los que se obtuvieron para los t_R . Estos resultados demuestran la ventaja de emplear estándar interno (ISTD), ya que la

¹ $\bar{X}_{ISTD} = 37.85$, $\sigma = 0.01$, CV = 0.03 %

presencia de este compuesto en las muestras bajo estudio proporciona mayor reproducibilidad y confiabilidad en la identificación cromatográfica.

3.1.3 Áreas y áreas relativas: Los valores de las áreas y áreas relativas de los patrones certificados de FAME`s, se muestran en la **Tabla 13**.

Tabla 13. Estudio de la reproducibilidad de las áreas y áreas relativas de la mezcla certificada de FAME`s.

FA`s	Áreas (cuentas)*		σ	CV, %		
	A _{FAME}	A _i /A _{ISTD}		A _{FAME}	A _i /A _{ISTD}	
C8:0	3590	0.328	58	0.001	1.6	0.3
C9:0	7840	0.72	64	0.02	0.8	2.1
C10:0	11000	1.01	216	0.03	1.9	3.3
C11:0	12700	1.16	289	0.04	2.3	3.6
C12:0	13900	1.27	430	0.06	3.1	4.4
C13:0	19000	1.73	244	0.05	1.3	2.6
C14:0	20000	1.9	1560	0.2	7.7	9.0
C15:0	20560	1.9	993	0.1	4.8	6.2
C16:1	5600	0.5	297	0.2	5.3	6.6
C16:0	39000	3.56	2159	0.03	5.5	6.9
C17:0	22000	2.0	1187	0.1	5.4	6.8
C18:2	460	0.043	55	0.005	6.8	9.8
C18:1	21000	1.9	1028	0.1	4.9	6.2
C18:0	40000	3.7	2746	0.3	11.9	8.1
C19:0	22000	2.0	2443	0.3	10.9	12.2
C20:2	500	0.046	44	0.003	8.6	7.3
C20:1	5680	0.52	53	0.01	0.9	2.3
C20:0	22100	2.02	301	0.05	1.4	2.7
C21:0	23300	2.1	822	0.1	3.5	4.8
C22:1	6000	0.55	433	0.05	7.3	8.6
C22:0	23000	2.1	1524	0.2	6.6	7.9

* Valor promedio (n=3)

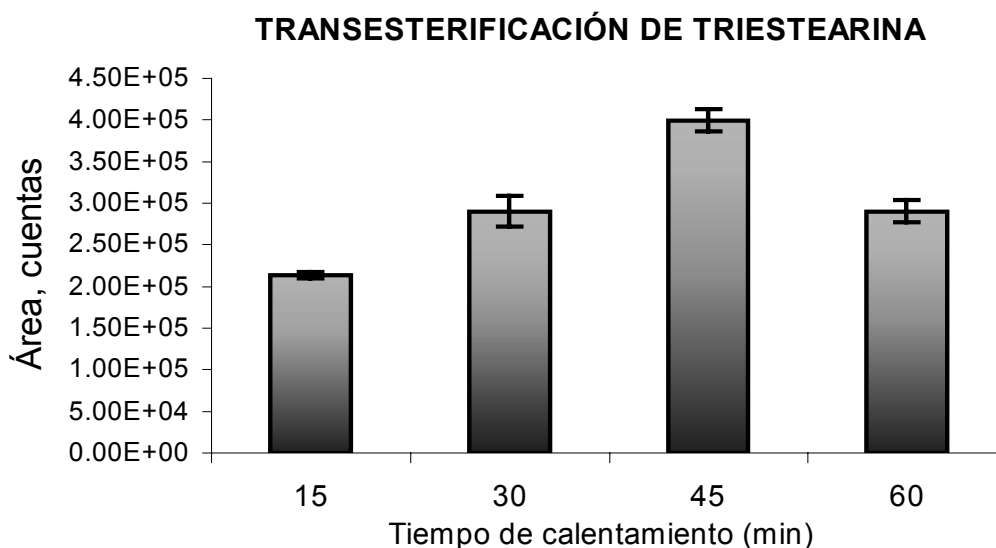
Los resultados que aparecen en la **Tabla 13**, muestran alta reproducibilidad en la medición de las áreas (A_{FAME}), excepto para los ácidos C18:0 y C19:0 (CV = 11.9 y 10.9 %, respectivamente), todos los demás cumplen con las exigencias de las

Buenas Prácticas de Laboratorio, que recomiendan valores inferiores al 10% para las áreas de los picos cromatográficos.

3.2 EFECTO DEL TIEMPO DE CALENTAMIENTO SOBRE LA TRANSESTERIFICACIÓN

Aunque la metodología implementada y validada por Fuentes [1999] en el Laboratorio de Cromatografía del Centro de Investigación en Biomoléculas, CIBIMOL, UIS, está bien establecida para el análisis de FA's, en forma de sus ésteres metílicos, para aceites vegetales, se hizo necesario en este proyecto, mejorar las condiciones de reacción utilizadas para el proceso de derivación. Se estudió el efecto que tiene el tiempo de calentamiento sobre la reacción de transesterificación, con miras a mejorar la eficiencia de derivación, con el propósito de detectar FA's a nivel de trazas. En la **Figura 7**, se pueden apreciar los resultados obtenidos de este estudio.

Figura 7. Efecto del tiempo de calentamiento sobre la transesterificación de un patrón de triestearina a su respectivo éster metílico.



Como puede apreciarse en la **Figura 7**, la eficiencia de derivación tiende a crecer a medida que se incrementa el tiempo de calentamiento, aunque después de los 45 min empieza a decaer. El porcentaje de derivación del patrón de triestearina más alto se alcanzó para un tiempo de calentamiento de 45 min. Este tiempo fue el seleccionado para realizar los procesos de derivación para las muestras estudiadas en este proyecto.

En la **Figura 7** se puede observar una disminución bien marcada en el área del estearato de metilo, para un tiempo de calentamiento de 60 min, debido, probablemente, a su descomposición térmica, por el calentamiento excesivo en el sistema de reacción.

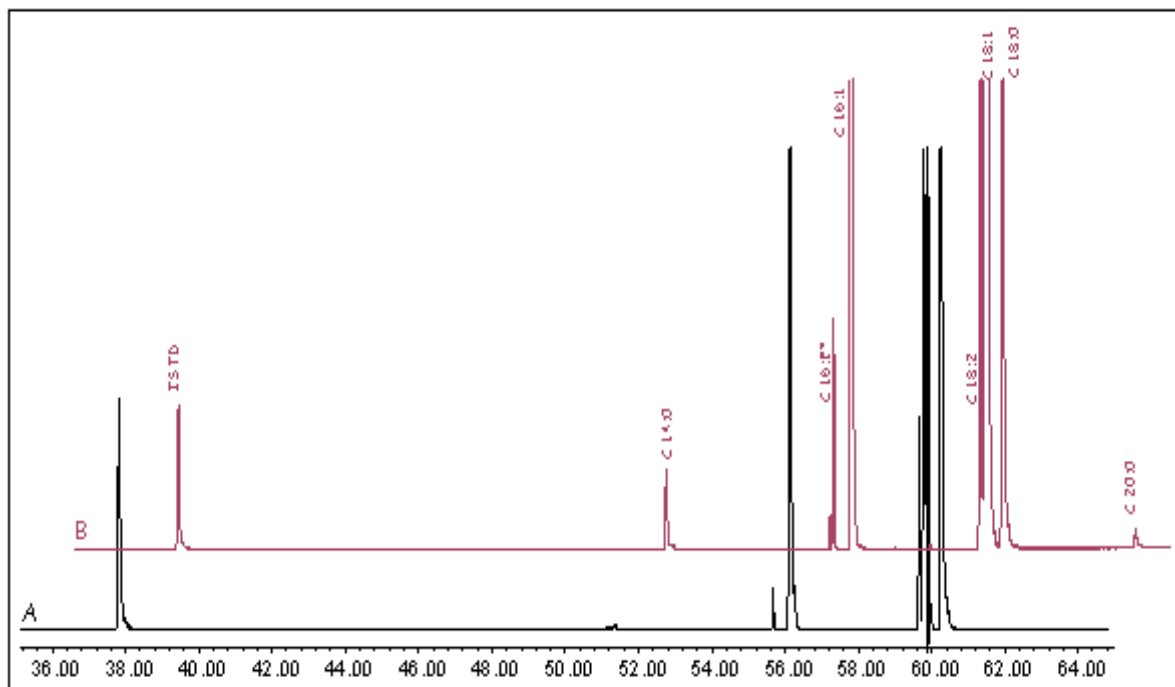
Los coeficientes de variación obtenidos para las áreas del estearato de metilo en función del tiempo de reacción, estuvieron por debajo de 6.29 %, cumpliendo de este modo con los requerimientos de las Buenas Prácticas de Laboratorio, que establecen un valor máximo del 10%.

3.3 CONTENIDO DE ÁCIDOS GRASOS EN *Atta laevigata*

La determinación de FA`s en la HC se llevó a cabo empleando dos técnicas de extracción diferentes, a saber: 1. Extracción con solvente seguida de derivación (método A) y 2. Extracción-derivación simultánea o transesterificación *in situ* (ISTE) (método B). Estas técnicas de extracción se describen en los numerales 2.2.2 y 2.5 respectivamente, de la Parte Experimental.

En la **Figura 8**, se compara el perfil cromatográfico de los FA`s obtenidos de las HC por dos técnicas de extracción empleadas.

Figura 8. Perfiles cromatográficos típicos de FA`s presentes en la HC, obtenidos por dos técnicas de extracción: A. extracción con solvente seguida de derivación; y B. Extracción - derivación simultánea o transesterificación *in situ* (ISTE).



En las metodologías usadas (métodos A y B), el reactivo $\text{BF}_3 / \text{CH}_3\text{OH}$ resultó ser un agente derivante excelente, para obtener los ésteres metílicos a partir de los TAG presentes de la HC, de una manera rápida, sencilla y reproducible.

En la **Tabla 14**, se muestran las composiciones promedio de FA`s presentes en la HC, obtenidas por dos metodologías empleadas. El método ISTE resultó ser más sensible que el método convencional de extracción, ya que permitió la detección de FA`s tales como C14:0, C16:1 (isómero) y C20:0, presentes en trazas, los cuales no se lograron aislar por la metodología convencional. Además de esto, ISTE es relativamente sencillo y rápido.

El ácido oleico (C18:1), fue el principal ácido graso en la HC (19.3 ± 0.9 mg / 100 mg de HC), según el método ISTE, mientras que por medio de la metodología convencional, el contenido de ácido oleico fue de 19.7 ± 0.8 mg / 100 mg de HC (ver **Tabla 14**).

A diferencia de ISTE, el método convencional resultó ser más reproducible, ya que los valores obtenidos para las desviaciones estándar de los diferentes FA`s fueron siempre más bajos.

Tabla 14. Concentración promedio de FA`s presentes en la HC, obtenidos por: A. Extracción con solvente seguida de derivación; y B. Transesterificación *in situ*.

FA`s	Concentración de FA`s en la HC*	
	(mg / 100mg de HC)	
	MÉTODO A	MÉTODO B
C14:0	-	0.040 ± 0.002
C16:0	6.09 ± 0.4	6.5 ± 0.6
C16:1	0.060 ± 0.005	0.070 ± 0.006
C16:1**	-	0.010 ± 0.001
C18:0	2.66 ± 0.06	2.71 ± 0.07
C18:1	19.7 ± 0.8	19.3 ± 0.9
C18: 2	0.27 ± 0.02	0.30 ± 0.03
C20:0	-	0.010 ± 0.009

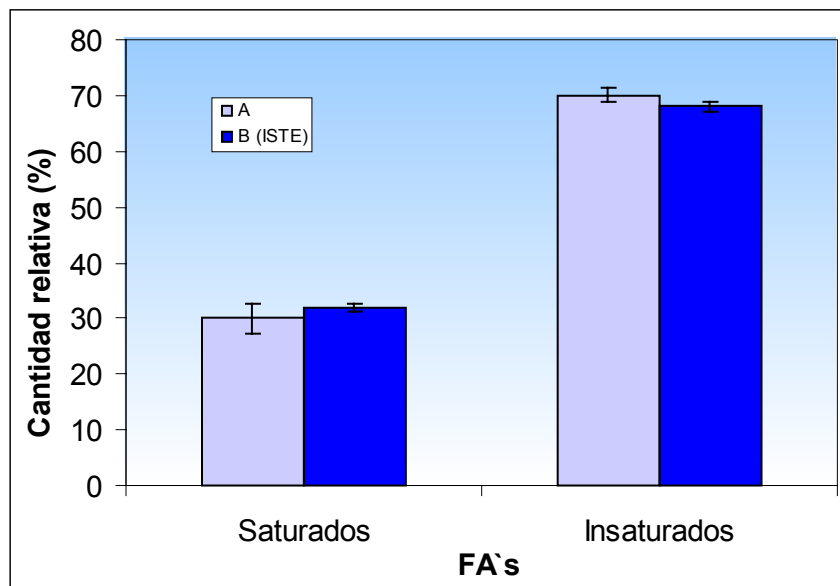
* Valor promedio (n=3) ** Isómero

Los resultados obtenidos por ambos métodos muestran una alta reproducibilidad y confiabilidad en la cuantificación de los FA`s presentes en la HC, ya que los coeficientes de variación estuvieron siempre por debajo del 10%, cumpliendo así con los requisitos de las Buenas Prácticas de Laboratorio.

3.3.1 Contenido de grasa en *Atta laevigata*

Debido a la necesidad de reportar en la información nutricional el contenido de grasa presente en un alimento, según lo exige la FDA, en este proyecto se determinó el contenido de grasa saturada e insaturada presente en la HC. La **Figura 9** presenta los resultados obtenidos por: A, Extracción con solvente seguida de derivación y B, Transesterificación *in situ* (ISTE). Como puede observarse en la **Figura 9**, la HC se caracteriza por poseer un contenido de grasa insaturada alto, cuyo valor fue de $\approx 70\%$ al aplicar el método convencional (A), y de $\approx 67\%$ al aplicar ISTE. El contenido de grasa insaturada encontrada en la HC, fue similar al reportado en la literatura para otros tipos de insectos [Dufour, 1987; Ramos, 1987]. Por lo tanto, la HC es, sin duda, una fuente natural autóctona, rica en UFA's.

Figura 9. Comparación del contenido de grasa saturada e insaturada en la HC, empleando diferentes técnicas de extracción.



La grasa total en la HC obtenida mediante extracción con solventes de acuerdo con el método de Folch [1957] fue de 30.6 ± 0.5 mg (valor promedio \pm desviación estándar) de grasa en 100 mg de muestra.

3.3.2 Comparación de ácidos grasos presentes en *Atta laevigata* antes y después del procesamiento de las hormigas

Una de las preguntas que se tenía en este proyecto, era saber si existe un cambio en la composición de FA`s presentes en la HC antes y después de ser sometidas éstas al proceso de tostado. En la **Tabla 15**, se muestran los resultados y el análisis estadístico obtenido de este estudio. Las determinaciones se llevaron a cabo empleando el método ISTE.

Tabla 15. Composición relativa (%) promedio de los FA`s presentes en la HC antes y después de ser procesadas, empleando el método ISTE.

FA`s	Cantidad relativa promedio (%)*	
	HC sin procesar	HC procesada
C14:0	0.12 ± 0.01	0.13 ± 0.01
C16:0	22.3 ± 0.9	23 ± 1
C16:1	0.30 ± 0.04	0.26 ± 0.03
C16:1**	0.070 ± 0.003	0.035 ± 0.003
C18:0	9.8 ± 0.4	9.5 ± 0.4
C18:1	68 ± 3	67 ± 3
C18:2	1.2 ± 0.2	1.1 ± 0.1
C20:0	0.070 ± 0.003	0.040 ± 0.003

*valor promedio (n=3) **Isómero

Como se puede apreciar en la **Tabla 15**, no se observaron diferencias significativas en la degradación de los UFA`s, con excepción de los ácidos C16:1

(isómero) y C20:0, que presentaron una degradación del 50 y 58%, respectivamente, durante el proceso de tostado de las HC.

3.3.3 Comparación de ácidos grasos presentes en *Atta laevigata* y en algunos aceites vegetales

Debido al contenido alto de grasa insaturada presente en la HC (similar a un aceite vegetal), se comparó su composición con la de algunos aceites comerciales de origen vegetal. En la **Tabla 16**, se muestran los resultados obtenidos al comparar la composición relativa (%) promedio de los FA`s presentes en la HC y en algunos aceites comerciales de origen vegetal.

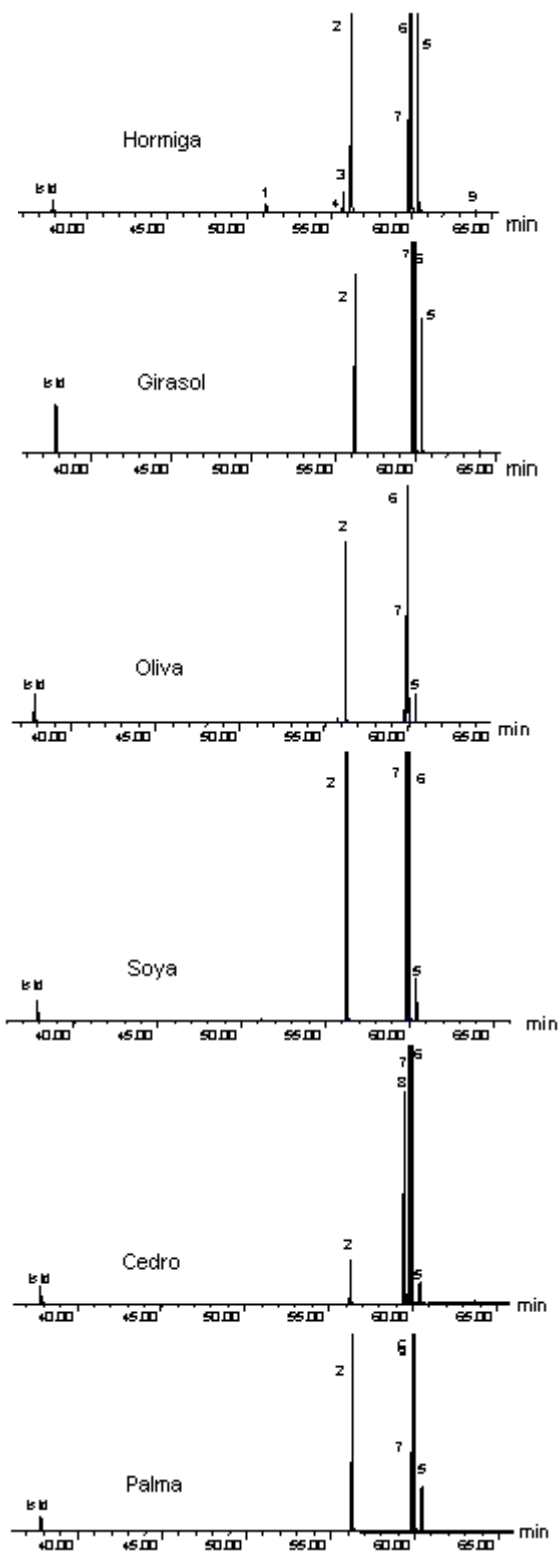
Tabla 16. Comparación del contenido de FA`s presentes en la HC y en algunos aceites vegetales.

Pico N°	FA`s	Cantidad relativa (%) de FA`s en las muestras bajo estudio					
		HC (ISTE)	Girasol	Oliva	Soya	Cedro	Palma
1	C14:0	0.13±0.01	-	-	-	-	-
2	C16:0	23±1	3.7±0.2	7.0±0.4	32.3±0.3	2.8±0.2	45.8±0.9
3	C16:1	0.26±0.03	-	-	-	-	-
4	C16:1*	0.035±0.003	-	-	-	-	-
5	C18:0	9.5±0.4	2.7±0.2	1.2±0.2	2.5±0.2	1.7±0.1	2.2±0.2
6	C18:1	67±3	36±1	87±1	49±1	32±1	48.6±0.7
7	C18:2	1.1±0.1	57.1±0.6	3.6±0.3	15.6±0.6	51.1±0.3	3.33±0.3
8	C18:3	-	-	-	-	11.4±0.8	-
9	C20:0	0.040±0.003	-	-	-	-	-

Promedio ± desviación estándar (n=3) *isómero

En la **Figura 10**, se pueden apreciar los perfiles cromatográficos de los FA`s presentes en la HC y en algunos aceites comerciales de origen vegetal, cuyos principales componentes se encuentran identificados en la **Tabla 16**.

Figura 10. Perfiles cromatográficos típicos de FA's presentes en: **A.** HC; **B.** Girasol; **C.** Oliva; **D.** Soya; **E.** Semilla de cedro y **F.** Oleína de Palma.



Los resultados obtenidos para los aceites vegetales fueron coherentes con los reportados en la literatura [Badui, 1996;]. Las pequeñas variaciones que se presentaron en los valores hallados son debidas al origen de los aceites analizados. El ácido linoleico (C18:2) fue el FA principal en los aceites de girasol y semilla de cedro, mientras que el ácido oleico (C18:1) se encontró en mayor proporción en el aceite de oliva, seguido por la HC, aceite vegetal de soya y oleína de palma.

3.4 IDENTIFICACIÓN DE FA`s EN *Atta laevigata* MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Con el fin de obtener una mayor certeza en la identificación de FA`s presentes en las muestras bajo estudio, se obtuvieron sus correspondientes espectros de masas, los cuales fueron comparados con los espectros de las bases de datos, Wiley 138 y NBS 74K del equipo (GC-MSD *Agilent Technologies 6890 Plus*, MSD 5973).

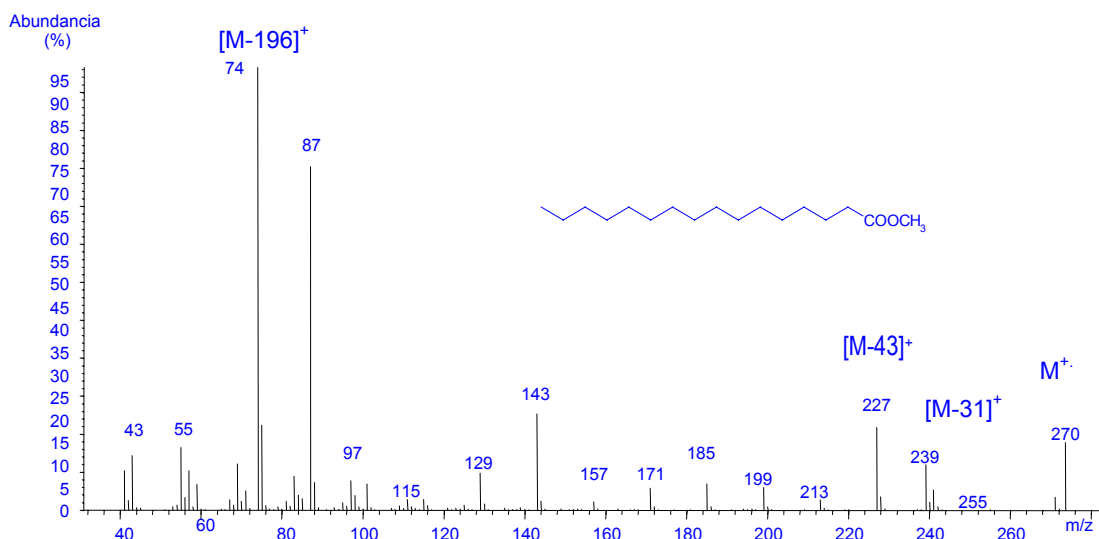
Para todos los FA`s analizados en forma de sus ésteres metílicos, el grado de coincidencia de los espectros de masas obtenidos para las muestras y los de la base de datos (biblioteca) del equipo, superó el 95 %, con excepción del isómero del C16:1, cuya “coincidencia” estuvo en ca. 80 %. Durante la interpretación “manual” de los espectros de masas, se estudiaron las respectivas rutas de fragmentación, típicas para los diferentes FAME`s.

En la **Figura 11**, se ilustra el espectro de masas del éster metílico del ácido palmítico, SFA mayoritario en la HC. En el espectro de masas de éste ácido, se destaca la presencia del ion pico de base, con una relación m/z 74, que corresponde a un rearrreglo McLafferty [McLafferty, 1993]. El ion molecular M^+ (m/z 270), con una intensidad baja (< 15%) se descompone eliminando los

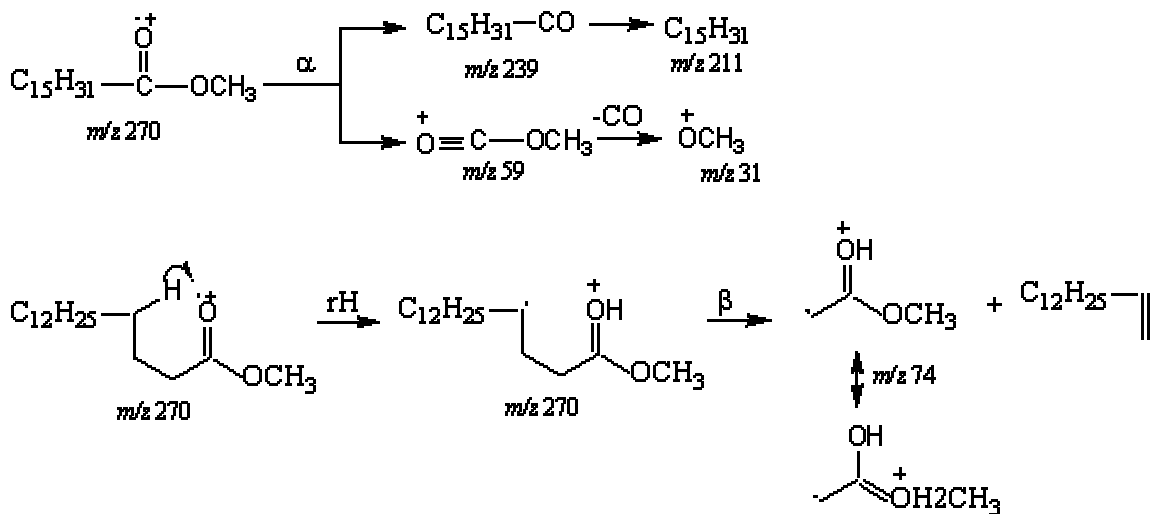
radicales $\text{CH}_3\text{O}^\cdot$ y $\text{C}_3\text{H}_7^\cdot$, con formación de los iones en m/z 239 y 227, respectivamente.

En el **Esquema 3**, se puede apreciar la ruta de fragmentación del éster metílico del ácido palmítico ($\text{C}_{16}:\text{O}$). Las rutas de fragmentación de los demás SFA's presentes en la HC, son similares.

Figura 11. Espectro de masas del éster metílico del ácido palmítico.



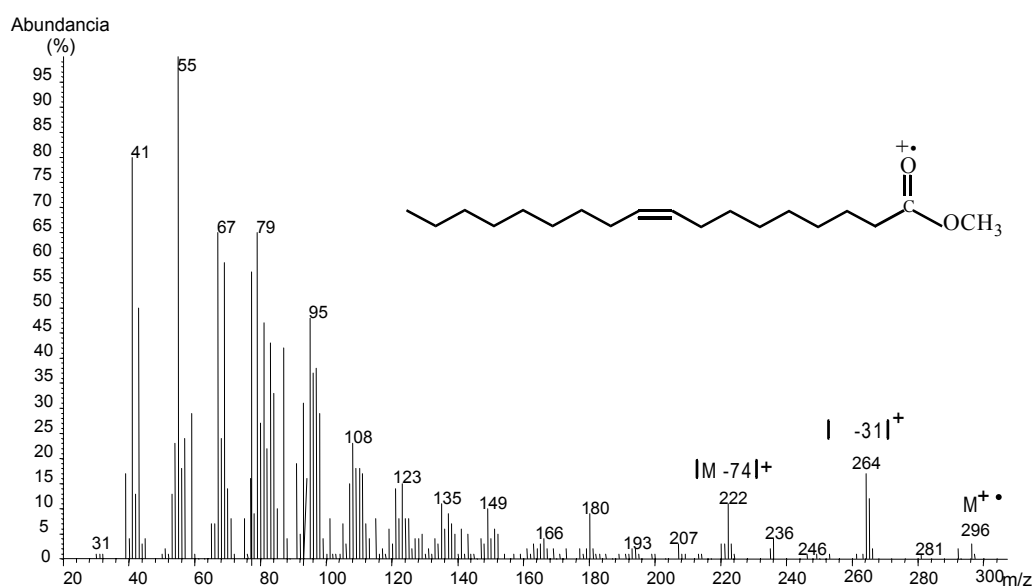
Esquema 3. Fragmentación típica del éster metílico del ácido palmítico.



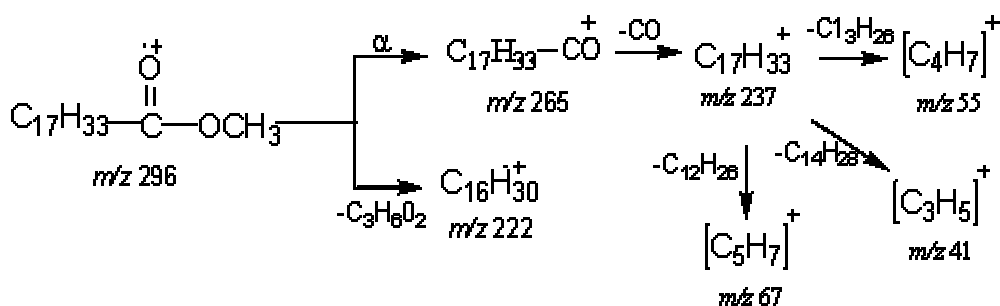
En la **Figura 12**, se presenta el espectro de masas del éster metílico del ácido oleico (C18:1), FA mayoritario en la HC. Su ruta de fragmentación, se ilustra en el **Esquema 4**, y se caracteriza por la formación del ion molecular, M^+ , en m/z 296 y los iones correspondientes a las pérdidas del radical $CH_3O\cdot$ y del reordenamiento McLafferty, $[M-74]^+$, en m/z 265 y 222 respectivamente. El ion pico de base, en m/z 55, corresponde a la formación del ion $[C_4H_7]^+$.

La posición de los enlaces dobles no puede determinarse y los isómeros *cis/trans* son indistinguibles, para este tipo de ácidos, cuando se utiliza impacto de electrones (EI, 70 eV), como fuente de ionización.

Figura 12. Espectro de masas del éster metílico del ácido oleico.



Esquema 4. Fragmentación típica del éster metílico del ácido oleico



4. CONCLUSIONES

El estudio de la reproducibilidad de los parámetros cromatográficos tales como tiempos de retención (t_R), tiempos de retención relativos (t_{RR}), áreas y áreas relativas, mostró coeficientes de variación inferiores a los valores máximos recomendados por las Buenas Practicas de Laboratorio (2% para t_R y 10% para áreas). Tales resultados indicaron alta reproducibilidad en el método cromatográfico y una excelente confiabilidad en la identificación de los FA's presentes en las muestras bajo estudio.

Las condiciones de reacción utilizadas en este proyecto para llevar a cabo el proceso de derivación de los FA's a sus correspondientes ésteres metílicos, presentaron mejores eficiencias de conversión, que las obtenidas en trabajos anteriores [Fuentes, 1999].

Se usaron dos métodos de extracción de ácidos grasos presentes en la hormiga "culona", de los cuales, la técnica transesterificación *in situ* resultó ser más sensible, sencilla, rápida y económica, comparada con el método convencional.

En la hormiga "culona" el ácido oleico (C18:1), es el más abundante, así como en los aceites de oliva y de soya. Su contenido fue de $19.3 \pm 0.9 / 100$ mg, obtenido con el método transesterificación *in situ*, mientras que empleando la metodología convencional se obtuvo el valor de 19.7 ± 0.8 mg / 100 mg.

En el proceso de tostado de la HC no se observaron diferencias significativas en la degradación oxidativa y/o térmica de los UFA's, con excepción de los ácidos C16:1 (isómero) y C20:0, que presentaron degradación del 50 y 58%, respectivamente.

La hormiga “culona” posee un contenido alto de grasa insaturada, ca. 67-70 %. Es, sin duda, una fuente natural autóctona de ácidos grasos insaturados.

5. RECOMENDACIONES

Se recomienda la implementación del método transesterificación *in situ* para el análisis de otras matrices, tales como cárnicos, embutidos y aves de corral, en laboratorios y entidades de la industria de alimentos, teniendo en cuenta su sensibilidad, rapidez, sencillez y economía.

Realizar el análisis de otros nutrientes alimenticios presentes en la hormiga “culona”, para cumplir las normas de etiquetado exigidas por la FDA y el Codex Alimentario para este alimento autóctono.

Determinar y comparar la composición de ácidos grasos presentes en los zánganos, así como en otras especies del género *Atta*, e.g. *A. cephalotes*, *A. columbica* y *A. sexctens*.

BIBLIOGRAFÍA

ABEL, K. D., SCHMERTZING, H.S. and PETERSON, J.I. Classification of microorganisms by analysis of chemical composition. Feasibility of utilizing gas chromatography. En: J. Bacteriol, Vol. 85 (1963); p. 1039-1044.

AMERICAN OIL CHEMISTISTS` SOCIETY. Official and tentative methods of the american oil chemists` society. 3 ed., Champaign, IL., Method Ce. (1973). p. 2-66.

_____, Instrumental Committee Of The American Oil Chemist`s Society. JAOAC. Vol. 43, No10A (1966); p. 10.

ANKLAM, Elke. Supercritical fluid extraction (SFE) in food analysis: A review. En: Food Additives and Contaminants. Vol.15, No. 6 (1998); p. 729-750.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis of the association of official analytical chemists. 15 ed. Arlington: Helrich, K. 1990. p. 1-5.

ASCHERIO, A. and Willett, WC. Health effects of trans fatty acids. En: Am. J. Clinical Nutrition. Vol. 66 (1997); p. 1006-1010.

BADUI, Salvador. Química de los Alimentos. México : Legman de México, 1996. p. 213-220.

BANNON, C.D. et al. Development of rapid procedures for the methoxide-catalysed methanolysis of fats and oils. En: J. Chromatogr. Vol. 247 (1982); p. 71-89.

BARNES, PC. and HOLADAY, C.E. Rapid preparation of fatty acid esters directly from ground peanuts. En: J. Chromatogr. Sci. Vol. 10 (1972); p. 181.

BEVERLY, M., BASILE, F. and VOORHEES, K. Fatty acid analysis of beer spoiling microorganisms using pyrolysis mass spectrometry. En: J. Am. Soc. Brew. Chem. Vol. 55 No. 2 (1997); p.79-82.

BLIGH, E. G., and DYER, W. J. A. rapid method of total lipid extraction and purification. En: Can. J. Biochem. Physiol. Vol. 37 (1959); p. 911-917.

BOHINSKI, R. Bioquímica. México : Addison-Wesley Iberoamericana, 1987. p. 2-3.

BRAGANCA, Marcos., *et al.* Parasitism characteristics of two phorid fly species in relation to their host, the leaf-cutting ant *Atta laevigata* (Smith) (Hymenoptera:Formicidae). En: Neotrop. Entomol. Vol. 31, No. 2 (2002); p. 241-244.

BROOKS, S. J., RATNAYAKE, W. And HOLLYWOOD, R. Measuring total lipid content in rat carcasses: A comparison of commonly employed extraction methods. En: J. Agric. Food Chem. Vol. 46 (1998); p. 4214-4217.

CAETANO, F., SILVA, R. and ROCHETTI, J. Nuclear DNA content of digestive cells of leaf-cutting ants *Atta laevigata* (Smith) (Hymenoptera: Formicidae) as a criteria for characterization of the castes. En: Bol. Entomol. Venez. Vol. 8 (2003); p. 111-114.

CANTELOPS, D., REID, R. And LONG, A. Determination of lipids in infant formula powder by direct extraction methylation of lipids and fatty acid methyl esters (FAME`s) analysis by gas chromatography. En: JAOAC. Vol. 82 (1999); p. 1128-1139.

CARRAPISO, Ana and GARCÍA, Carmen. Development in lipid analysis: Some new extraction techniques and *in situ* transesterification. En: Lipids. Vol. 35, No. 11 (2000); p. 1167-1177.

CARRAPISO, Ana. *In situ* transesterification of fatty acids from Iberian pig subcutaneous adipose tissue. En: Meat Science. Vol. 56 (2000); p.159-164.

CASADO, Eva. (2001). Combinación de grasas, prevención cardiovascular. [Citado Julio 17 de 2003]. Disponible en internet: www.canalsalud.com/vivirenforma/dietetica/opinion/default.htm.

CAVA, R., RUIZ, J. And ANTEQUERA, T. Influence of finishing diet on fatty acid profiles of intramuscular lipids, triglycerides and phospholipids in muscles of the iberian pig. En: Meat Science. Vol. 45 (1997); 263-270.

CHARDIGNY, J.M. *trans* Mono- and polyunsaturated fatty acids in human milk. En: Eur. J. Clin Nutr. Vol. 49 (1995); p. 523-531.

CHOONG, Youk, LIN, Hsiu and CHEN, Chung. A rapid gas chromatographic method for direct determination of free sterols in animal and vegetable fats and oils. En: Journal of Food and Drug Analysis. Vol. 7, No. 4 (1999); p. 279-290.

CHRISTIE, William. The analysis of evening Primrose oil. En: Industrial Crops and Products. Vol. 10 (1999); p. 73-83.

_____. Gas Chromatography and Lipids: A Practical Guide. Dundee : The Oily Press, 1989. p. 11-41, 303-444.

_____. Preparation of ester derivatives of fatty acids for chromatographic analysis. En: _____. Advances in lipid methodology. Dundee : The Oily Press, 1993. p. 69-111.

CORONADO, P. Introducción a la entomología; formología y taxonomía de los insectos. México : Limusa - Wiley, 1972. p. 256-258.

CYBERLIPID CENTER. Purification and analysis of simple or neutral lipids, Analysis of fatty acids. [Citado Junio 6 de 2003]. Disponible en internet: www.cyberlipid.org/cyberlipid /anl0010htm.

DE LA CRUZ, M. *et al.* Gas chromatography determination of the fatty acid content of heat-treated green beans. En: J. Chromatogr. A. Vol. 891 (2000); p.367-370.

DELFINO, Mario y SARNO, Maria del Carmen. Perfil de ácidos grasos de algunos alimentos autóctonos de origen animal. Cátedra de análisis instrumental. Argentina facultad de Ciencias Exactas y Naturales. UNNE., 1999. p. 1-8.

DESTAILLATS, Frederic. A simple base-catalized methodology for the synthesis of fatty acid derivatives. En: Lipids. Vol. 37 (2002); p. 527-528.

Dionex Corporation. Determination of fat in dried milk products using accelerated solvent extraction (ASE): Application Note 340. (2000); p. 1-2.

_____. Determination of total fat in powdered infant formula using accelerated solvent extraction (ASE): Application Note 329. (1999); p. 1-4.

DIONISI, F., AESCHLIMANN, J.M. and HOULLEMAR, A. Supercritical CO₂ extraction for total fat analysis of food products. En: J. Food Sci. Vol. 64, No. 4 (1999); p. 1-6.

DRUCKER, D.B. The identification of *Streptococci* by gas liquid chromatography. En: Microbios. Vol. 5 (1972); p. 109-112.

DUFOUR, D. Insects as food: A case study from the Northwest Amazon. En: American Anthropologist. Vol. 89, No. 2. (1987); p. 383-397.

ELVEVOLL, E. O. and JAMES, D. G. Potential Benefits of Fish for Maternal, Foetal and Neonatal Nutrition: a Review of the Literature. En: Food. Nutrition and Agriculture. Vol. 27 (2000); p. 28-39.

ENARVÁEZ. Aula Virtual de Biología: Curso de Biología Molecular y Celular [Citado noviembre 14 de 2003]. Disponible en internet: <http://interbiologia.virtualave.net/molecula/lipfuncion.htm>.

ERICKSON, M.C. Lipid extraction from channel catfish muscle: Comparison of solvent systems. En: J. Food Sci. Vol. 58 (1993); p. 84-89.

EVERSHED, R. Gas chromatography of lipids. En: HAMILTON, R.J. and Hamilton, S. Lipid analysis: A practical approach. Oxford : Oxford University Press, 1992. p. 113-150.

FEDERAL REGISTER. No. 58 (1993); p. 2070.

FIRESTONE, D. and SHEPPARD, A. Determination of *trans* fatty acids. En: CHRISTIE, W.W. Advances in lipid methodology-two. Dundee : The Oily Press, 1992. p. 273-322.

FOLCH, J., LEES, H. and SLOANE, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. En: J. Biol. Chem. Vol. 226 (1957); p. 497-509.

FRANCO, ANA. Aislamiento, caracterización y taxonomía de los hongos por *Atta spp.* Y *Acromyrmex spp.* (Hymenoptera:Formicidae). [Citado octubre 12 de 2003]. Disponible en internet: <http://investigacion.udea.edu.co.htm>.

FRIEDBERG *et al.* Fish oil and glycemic control in diabetes. En: Rev. Diabetes Care. Vol. 21 (1998); p. 494-498.

FUENTES, Hernán. Monitoreo de la termodegradación de ácidos grasos en aceites vegetales de consumo humano, por medio de cromatografía de gases de alta resolución y evaluación *in vitro* de la actividad antioxidante de productos naturales. Bucaramanga, 1999, 131 p. Trabajo de grado (Químico). Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de Química.

GARCÍA, L.E. The total extraction in foodstuffs laboratories: improvements in conventional Soxhlet extraction by the use of focused microwaves. Poster En Novenas jornadas de análisis instrumental en productos comestibles (noviembre. 26-30 de 2002 : Barcelona).

GONZÁLEZ, J. Biología Molecular de la Universidad del País Vasco, [Citado octubre 22 de 2003]. Disponible en internet: www.ehu.es/biomoleculas/.

GUNSTONE, F. D. High resolution ^{13}C NMR spectroscopy of lipids. En: CHRISTIE, W.W. Advances in lipid methodology-two. Dundee : The Oily Press, 1992. p. 1-68.

GUR, M.I. and Harwod, J.L. Lipid biochemistry: an introduction. London : Chapman & Hall, 1991. p. 406.

HAMILTON, R.J. and Hamilton, S. Lipid Analysis: A Practical Approach. Oxford : University Press, Oxford, 1992. p. 1-4, 263-267.

HARVEY, D. Mass spectrom of picolinyl and other nitrogen-containing derivatives of lipids En: CHRISTIE, W.W. Advances in lipid methodology-two. Dundee : The Oily Press, 1992. p. 19-80.

HERNÁNDEZ, José. Growth of *Atta laevigata* (Hymenoptera: Formicidae) nest in pine plantations. En: Entomol. Florida. Vol. 82 (1999), p. 93-103.

HERNÁNDEZ, José y JAFFÉ, Klaus. Daño económico causado por poblaciones de hormigas *Atta laevigata* en plantaciones de *Pinus caribaea*: Elementos para manejo de plaga. En: Anais Soc. Entomol. Brasil. Vol. 24 (1995), p. 287-298.

INNIS, S.M. Essential fatty Acid Requirements in Human Nutrition. En: Can. J. Physiol. Pharmacol. Vol. 71 (1993); p. 699-706.

INNOVACION Y CIENCIA. Vol. 10, No. 1 (2002); p. 27-29.

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. Standard method for the analysis of oils, fat and derivatives. Applied Chemistry Division, Commission on Oils, fats and Derivatives. 6 ed. part 1 (sections 1 and 2) Oxford, 1979. p. 1-6. (IUPAC method 2.301, Section 3).

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. Animal and vegetable fats and oils- Analysis by gas chromatography of methyl esters of fatty acids. Geneva:ISO, 1990. 7p. [ISO 5508 (E)].

_____.Animal and vegetable fats and oils- Preparation of methyl esters of fatty acids. Geneva:ISO, 1978. 6p. [ISO 5509 (E)].

IVERSON, J. and SHEPARD, A. Butyl ester preparation for gas-liquid chromatographic determination of fatty acids in butter. En: JAOAC Int. Vol. 60 (1997); p. 284-288.

JAMES, A.T. and MARTIN, A.T.J. Gas-liquid partition chromatography: The separation and microestimation of volatile fatty acids. En: Biochem. J. Vol. 50 (1952); 679-690.

JATAR, A. Ciencias de la Naturaleza y Tecnología. [Citado octubre 22 de 2000]. Disponible en internet:<http://www.tuotromedico.com/temas/grasas.htm>.

KARLSON, P. Manual de bioquímica para médicos, naturalistas y farmacéuticos. Barcelona : Marin, 1965. p. 94-96.

LABCONCO CORPORATION. Extractor de Goldfish. Kansas : La Corporación, 2003. p. 1-2.

LEHNINGER, A. L. Bioquímica. Barcelona ; Omega,1980. p. 285-289.

LEPAGE, G., and ROY, C.C. Direct transesterification of all classes of lipids in a one step reaction. En: J. Lipids Res. Vol. 27 (1986); p. 114-120.

LIU, K.S. Preparation of fatty acid methyl esters for gas-Chromatographic analysis of lipids in biological material. En: JAOCS. Vol. 71 (1994); p. 1179-1187.

LIU, Yaquian, CHO, Seong and DANIELSON, Neil. Solid-phase microextraction and on-line methylation gas chromatography for aliphatic carboxylic acids. En: Anal. Bioanal. Chem. Vol. 373, No. 1 (2002); p. 64-69.

LÓPEZ-LÓPEZ, A., CASTELLOTE-BARGALLO, A. and LÓPEZ- SABATER, A. Comparison of two direct methods for the determination of fatty acids in human milk. En: Chromatographia. Vol. 54, No. 11 (2001); p. 743-747.

MADRID, A. *et al.* Manual de aceites y grasas comestibles. Madrid : El autor, 1997. p. 11-25.

MARIANE, L. La dieta como determinante del desarrollo del sistema nervioso central: Rol de los ácidos grasos esenciales. En: Rev. Archivos Latinoamericanos de nutrición. Vol. 48, No. 1 (1998); p. 29-33.

MARTÍNEZ, Victor. Vida de las Hormigas Culonas Santandereanas. 2 ed. Bucaramanga : *s.n.*, 1973. 41p.

McLAFERTTY, F.W. and Turecek, F. Interpretation of Mass Spectra. California : University Science Books, 1993. p. 374.

MEDINA, H. Antecedentes biológicos, culturales e históricos de la Hormiga Culona. Revista electrónica Insectarium Virtual [Citado Diciembre 01 de 2003]. Disponible en internet: <http://www.insectariumvirtual.com/reportajes/culonas/culonas lite>.

METCALFE, L. D and SCHMITZ, A. A. The rapid preparation of fatty acids methyl esters for gas chromatography analysis. En: Anal. Chem. Vol. 33 (1961); p 363-364.

MINICH, Deanna. Essential fatty acid absorption and metabolism. Chicago, 1999, 151 p. Thesis Doctorate in Medical Sciences. University of Groningen, EE.UU.

MORENO, Nelson y DURAN, Tilcia. Evaluación de la variación del perfil ácido del grano de cacao durante los procesos de fermentación y de secado. Bucaramanga, 1999, 109 p. Trabajo de grado (Químico). Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de Química.

MOYA, Miguel. El mundo de los insectos "Entomofagia". [Citado Diciembre 18 de 2003]. Disponible en internet: <http://www.entomologia.net/cocina.htm>.

MURRAY, Robert. *et al.* Bioquímica de Harper. 15 ed. México : Manual moderno, 2001. p. 169-182.

NGEH-NGWAINBI, James and CHANDLER, Anthony. Determination of total, saturated, unsaturated, and monounsaturated fats in cereal products by acid hydrolysis and capillary gas chromatography: Collaborative study. En: JAOAC. Vol. 80 (1995); p. 359-372.

ORTEGA, Oscar. Hormigas cortadoras de hojas y deforestación. EN: Aconteceres entomológicos "Para comprender los insectos: estudiarlos" Medellín : Todográficas, 1999. p. 253-266.

PALMQUIST, D. L., and JENKINS, T. C. fat in lactation rations. En: J. of Dairy Science. Vol. 63 (1980); p. 1-14.

PARK, P. W. and GOINS, R.E. *In situ* preparation of fatty acid methyl esters for análisis of fatty acid composition in foods. En: J. Food Sci. Vol. 59 (1994); p. 1262-1266.

PEUCHANT, E. *et al.* One-step extraction of human Erythrocyte lipids allowing rapid determination of fatty acid composition. En: Anal. Biochem. Vol. 181 (1989); p. 341-344.

QUIJANO; I. Zoocriadero La "culona", Betulia, Santander. y Criadero El Guamito, Mogotes, Santander. [Citado Diciembre 22 de 2003]. Disponible en internet: <http://www.plazacolombiacom/hormigasculonas/ficha>.

RAMOS, J. Los insectos como fuente de proteínas en el futuro. México : Limusa, 1987. p 148.

RECKZIEGEL, Aurélia, FRANCKE, Wittko and KLINGENBERG, Christiana. Investigations on the stereochemical composition of volatiles of the leaf-cutting ant *Atta laevigata*. Memorias del 17 Meeting Anual de la Sociedad Internacional de Química Ecológica. (Brazil, 2002). p. 38.

RODRÍGUEZ-PALMERO, M. LOPEZ- SABATER, A. and RIVERO-URGUPELL, M. Comparison of two methods for the determination of fatty acid profile in plasma and erythrocytes. En: J. Chromatogr. A. Vol. 778 (1997); p. 435-439.

RONAYNE, Patricia. Importancia de los ácidos grasos poliinsaturados en la alimentación del lactante. En: Arch. Argent. Pediatr. Vol. 98, No. 4 (2000); p. 231-238.

RUEDA, E., DELGADO, J., Martinez, J. and STASHENKO, E. Fatty acids profiles of *Atta laevigata* (big-bottom ant), a food product consumed in Santander, Colombia. Poster En: III SIMPOSIO INTERNACIONAL SOBRE SEPARACIÓN EN BIOCIENCIAS (2003 : Moscú). Memorias del III Simposio Internacional sobre separación en Biociencias. Moscú. p. 87.

SALZEMANN, A. P., NAGNAN, F. and JAFFE, K. Leaf-cutting ant *Atta laevigata* (Formicidae; Attini) marks its territory with colony specific dufour gland secretion. En: J. Chem. Ecol. Vol. 18 (1992); p. 183-196.

SATLER, W, H. PUHL, H. and ESTERBAVER, H. Determination of fatty acids in the main lipoprotein classes by capillary gas chromatography: BF_3 /methanol transesterification of lyophilized samples. En: Anal. Biochem. Vol. 198 (1991); p. 184-190.

SEGURA, R. Preparation of fatty acid methyl esters by direct transesterification of lipids with aluminium chloride-methanol AlCl_3 -methanol. En: J. Chromatogr. Vol. 441 (1988); p. 99-113.

SERNA, Francisco. Las hormigas, bioindicadoras de la salud de los ecosistemas terrestres. En: Aconteceres entomológicos "Para comprender los insectos: estudiarlos" Medellín : Todográficas , 1999. p. 209-232.

SHEPHERD, A and IVERSON, J. Extraction of lipids and derivatives. En: HAMILTON, R.J and Hamilton, S. Lipid Analysis: A Practical Approach. Oxford : University Press, Oxford, 1975. p. 263-267.

SOBERMAN, R. The effects of fish oil on connective tissue metabolism and connective disease. En: CARRAPISO, A. and GARCÍA,C. Development in lipid analysis: Some new extraction techniques and *in situ* transesterification. En: Lipids. Vol. 35 (1975); p. 1167-1177.

STRYER, L. Bioquímica. Barcelona : Reverté, 1988. p. 54-156.

SUPELCO Inc. Comparison of 37 Component FAME's Standard on Four Capillary GC Columns, Bulletin Number 907, Vol. 5. (1997); p.2-6.

TORRES, Alexandre. *et al.* Mathematical method for the prediction of retention times of fatty acid methyl esters in temperature programmed capillary gas chromatography. En: J. Agric. Food Chem. Vol. 50, No. 15 (2002); p. 4156-4163.

TOUSSAINT, G. Ácidos grasos esenciales. [Citado agosto de 2003]. Disponible en internet: <http://www.nutrioli.com.mx/omegas.htm>.

ULBERTH, F. and HENNINGE, M. One-step extraction /methylation method for determining the fatty acid composition of processed foods. En: JAOCS. Vol. 69 (1992); p. 174-177.

VORBECK, M. *et al.* Preparation of methyl esters of fatty acid for gas chromatography, quantitative comparison of methylation techniques. En: Anal. Chem. Vol 33 (1961); p.1512-1514.

WADA, Shun. Rapid analysis of polyunsaturated by NMR and LC-MS. En: Lipid Technology. Vol. 13, No. 13 (2001); p. 116-119.

WANG, Y., SUNWOO, H. And SIM, J. Fatty acid determination in Chicken Egg Yolk: A comparison of different methods. En: Poultry Science. Vol. 79 (2000); p. 1168-1171.

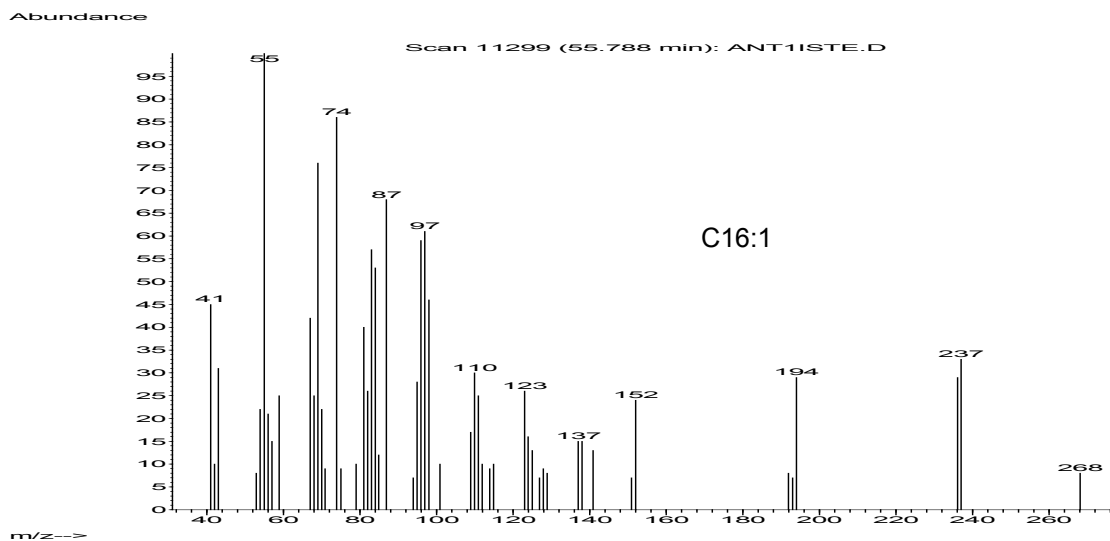
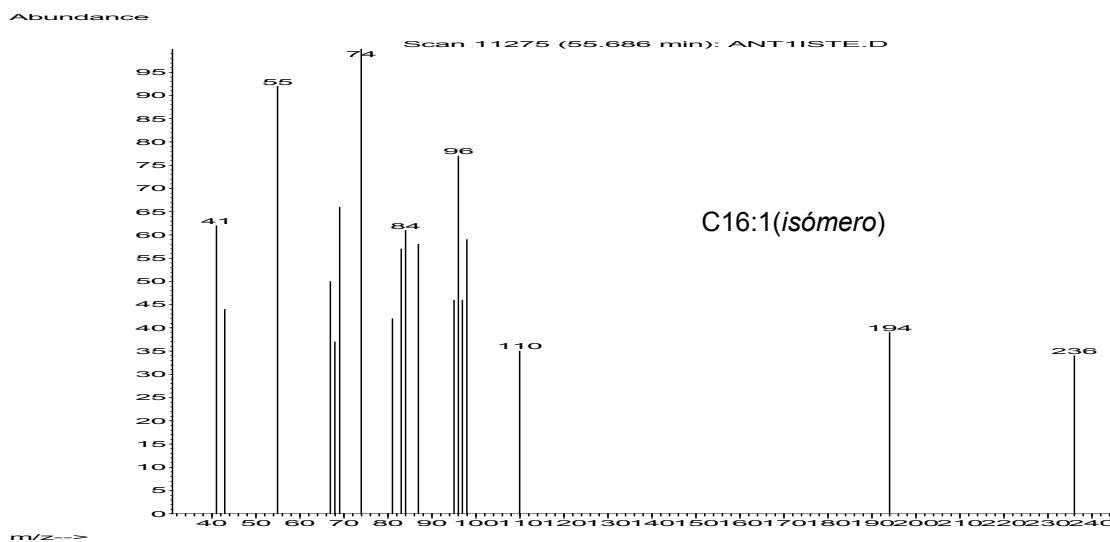
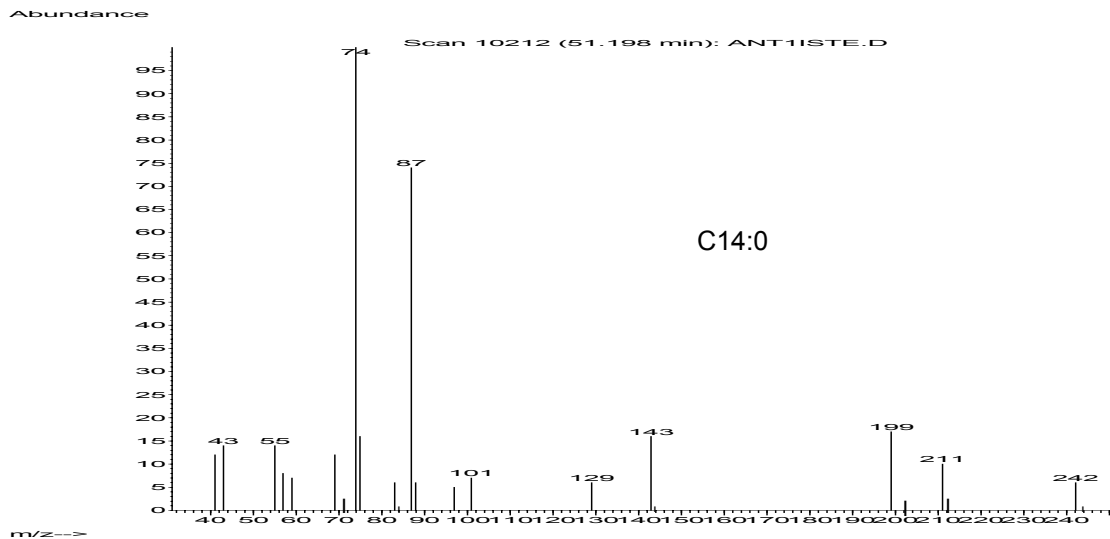
WEBER, N. Fungus growing ants. En: Science. Vol.153 (1966); p. 587-604.

WISEMAN, J. Assigning energy values to ingredients for pigs. En: Proceedings Feed Ingredients Asia. Vol. 10 (1997); p. 1-9.

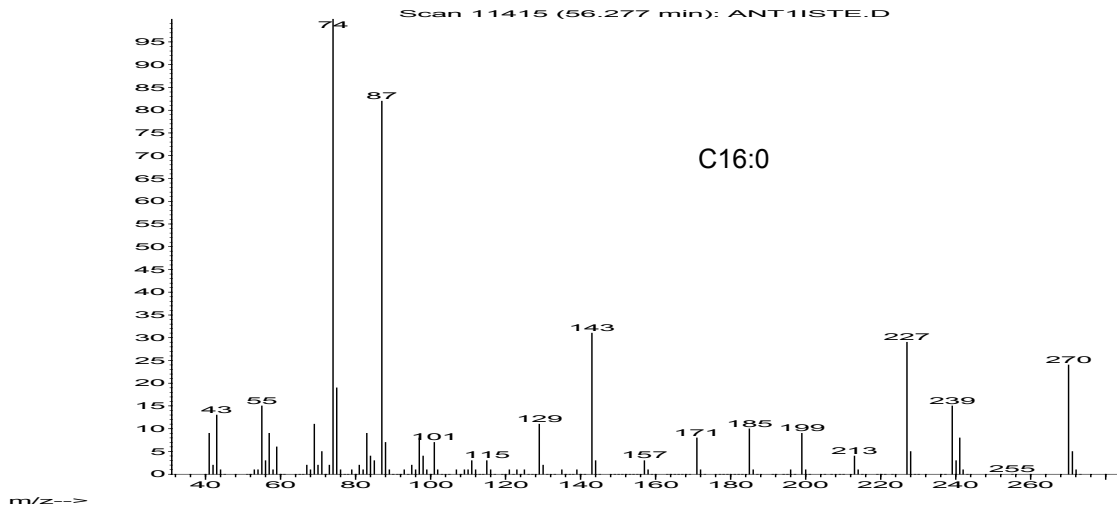
YANIV, Z. SCHAFFERRMAN, M. SHAMIR, I. *Matthiola incana*: Source of omega-3-linoleic acid. Arlington : Ashs. Press, 1996. p. 368-372.

ANEXO 1

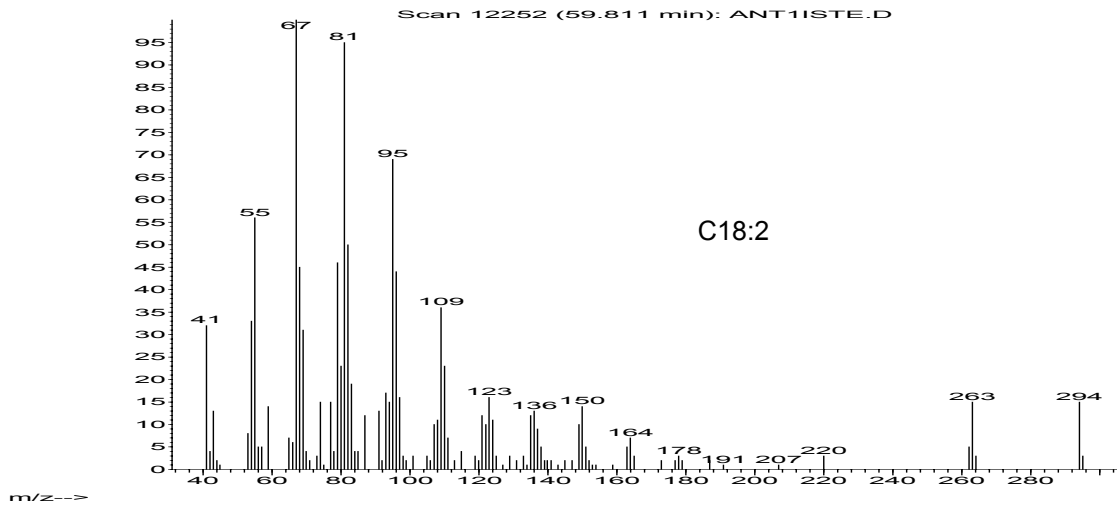
Espectros de masas de los FA's presentes en la HC, en forma de sus ésteres metílicos.



Abundance



Abundance



Abundance

