

00567
2
2ij



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

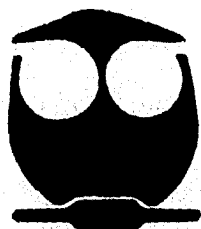
EVALUACION DE DETERIORO QUIMICO EN CARNE
DE RES Y PESCADO CONGELADOS

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRIA EN CIENCIA DE ALIMENTOS
(QUIMICA DE ALIMENTOS)

P R E S E N T A
DONOSO MOSCOSO, SILVANA PATRICIA

ASESORA: M. EN C. FRANCISCA ITURBE CH.



MEXICO, D. F.

1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

A mis padres Pablo y Elisa,

a mi esposo Xavier y

a mi hijo Pablo Xavier.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesora, la M. en C. Francisca Iturbe Chiñas por sus enseñanzas y dedicación.

A mis maestros y a todas las personas que me apoyaron para llegar hasta aquí.

A toda mi familia y en especial a mi hermana Ana María.

A mi amigo Gerardo Flores C. quien siempre estuvo dispuesto a ayudarme.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la Universidad Nacional Autónoma de México por su invaluable apoyo para la culminación de mis estudios de Postgrado.

A este hermoso país, México y a su gente por haberme brindado la oportunidad de superarme.

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
I. GENERALIDADES	5
I. 1. ACEITES Y GRASAS	
A. Estructura general y composición	
B. Propiedades generales	6
C. Papel de lo lípidos en la nutrición	7
D. Grasas animales	
E. Análisis y pruebas	8
I. 2. LIPIDOS EN PRODUCTOS CARNICOS	9
A. Lípidos en tejido adiposo	10
B. Lípidos del músculo	
C. Cortes de carne de res	11
I. 3. LIPIDOS EN PRODUCTOS MARINOS	12
A. Lípidos del pescado	
I. 4. AUTOOXIDACION DE LIPIDOS	13
A. Mecanismo de la oxidación de lípidos	16
B. Productos secundarios de degradación	18
C. Oxidación con oxígeno singulete	19
D. Descomposición de hidroperóxidos	20
E. Pro-oxidantes	22
I. 5. PRESERVACION DE LOS ALIMENTOS	24
A. Refrigeración y congelación de carne y pescado	
I. 6. TECNICAS PARA EL ANALISIS DE RANCIDEZ OXIDATIVA	29
A. Métodos químicos	
I. Determinación del Valor Peróxido	

2. El Índice de TBA	31
3. Medición de productos carbonilo totales y volátiles	34
4. Índice de Kreis	35
B. Métodos físicos	37
1. Fluorescencia	
2. Espectroscopia infrarroja	38
3. Cromatografía de gases	39
4. Refractometría	
5. Método de los dienos conjugados	
I. 7. EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS Y DE PRODUCTOS DE OXIDACIÓN DE LÍPIDOS	
A. Disolventes para extracción de lípidos	40
B. Procedimientos de extracción de lípidos	42
B.1. Extracción continua por percolación o lavado continuo del material con el disolvente	43
B.2. Extracción intermitente	
B.3. Digestión	44
B.4. Métodos físicos de extracción de lípidos	46
II. TRABAJO EXPERIMENTAL	48
II. I. 1ª ETAPA: ESTANDARIZACIÓN DE MÉTODOS	
A. Métodos de extracción y cuantificación del material lipídico.	49
1. Método de Bligh y Dyer	
2. Método de Goldfish	
3. Selección del disolvente	50
4. Cuantificación de lípidos	
B. Métodos de análisis de deterioro de lípidos	51
1. Índice de Peróxido	
a) Método de la AOAC	
b) Método Colorimétrico	52
2. Índice de TBA	54
3. Índice de Kreis	

II. 2. 2ª ETAPA: MONITOREO DEL DETERIORO OXIDATIVO DE LIPIDOS EN CARNE DE RES (SIRLOIN) Y PESCADO (SARDINA) CONGELADOS	56
A. Preparación de las muestras	
B. Extracción directa de lípidos con disolventes	
C. Cuantificación de lípidos totales	57
D. Cuantificación de índices de oxidación en los lípidos de las muestras en almacenamiento	
II. 3. ANALISIS ESTADISTICO	
A. Cuadrado latino y cuadrado latino en bloque	58
III. RESULTADOS Y DISCUSION	59
III. 1. 1ª ETAPA: ESTANDARIZACION DE METODOS Y SELECCION DE LOS DISOLVENTES	60
A. Trabajo preliminar	
B. Determinación del efecto del disolvente en la cuantificación y en los índices de oxidación de lípidos	62
III. 2. 2ª ETAPA: MONITOREO DE LA OXIDACION DE LIPIDOS EN LAS MUESTRAS DE CARNE DE RES Y PESCADO, ALMACENADAS EN CONGELACION A -18° C.	67
1. Monitoreo de la oxidación de lípidos en carne de res	68
2. Monitoreo de la oxidación de lípidos en sardina mexicana	72
3. Monitoreo de la oxidación de lípidos en sardina portuguesa	76
IV. CONCLUSIONES	80
BIBLIOGRAFIA	
APENDICE	

RESUMEN

La importancia de la carne se debe a su atractivo sensorial y al elevado valor nutritivo, de allí que el hombre desde tiempos muy antiguos se ha preocupado en conservarla en las mejores condiciones para su consumo. La congelación es un excelente procedimiento desarrollado con este fin, su eficacia radica en la deshidratación interna por formación de cristales de hielo y en el descenso de la temperatura con lo que se reduce la oportunidad de desarrollo de los microorganismos, sin embargo en estas condiciones se favorece la oxidación de lípidos que conlleva la producción de compuestos, que le confieren al alimento características indeseables.

La mayoría de los métodos que permiten detectar este proceso de deterioro requieren los lípidos separados de la matriz, lo cual hace que el disolvente de extracción sea muy importante. El éter de petróleo y el éter etílico son los disolventes más utilizados y son los recomendados en los métodos oficiales. Las mezclas de disolventes con distintas polaridades son bastante efectivas y para ciertos alimentos dan mejores resultados que los disolventes oficiales.

En este trabajo se probaron diferentes métodos de extracción de lípidos y de determinación de la oxidación de los mismos, sobre matrices alimenticias que se comercializan en congelación en grandes volúmenes, en las cuales se monitoreó el deterioro químico durante almacenamiento prolongado.

La extracción de lípidos se realizó utilizando el método de Bligh and Dyer, por extracción directa con disolventes y la cuantificación en una alícuota obtenida de la extracción.

La oxidación de lípidos se determinó por Índice de Peróxidos (por los métodos de la AOAC y el colorimétrico), Índice de TBA e Índice de Kreis.

Se determinó que la mezcla de disolventes diclorometano:metanol es la apropiada cuando se trata de analizar lípidos en carne de res y el éter etílico lo es para el análisis de los lípidos del pescado, específicamente sardina.

Al realizar el monitoreo de los productos de oxidación en muestras de sardina y carne de res, almacenadas a -18°C , durante aproximadamente un año, se encontró que para sardina mexicana el máximo en los índices de oxidación se obtiene a los 250 días y tratándose de carne de res se alcanza en 300 días aproximadamente. Para la muestra de carne de res (sirloin) el Índice de TBA* máximo es de 4.8mg MA**/Kg muestra, el Índice de Peróxido por el método de la AOAC es de 13.9meq/Kg grasa y por el método Colorimétrico es 36.9meq/Kg grasa, el Índice de Kreis máximo por gramo de grasa es 41.6. Para la muestra de sardina mexicana el Índice de TBA máximo es 39.7mgMA/Kg muestra, el Índice de Peróxido por el método de la AOAC es de 96meq/Kg grasa y por el método Colorimétrico es 293meq/Kg grasa, el Índice de Kreis máximo así mismo es de 490 por gramo de grasa.

* TBA: ácido tiobarbitúrico

** MA: malonaldehído

INTRODUCCION

Los lípidos son indispensables en la dieta humana, aportan la mayor parte de energía requerida por el organismo, así como el ácido linoleico esencial en la nutrición y las vitaminas liposolubles que se hallan incluidas dentro de los lípidos consumidos a diario.

La producción primaria de alimentos y los insumos para su transformación son las actividades iniciales de la cadena alimentaria, en este punto se inician también las actividades económicas. El adecuado control de la calidad de los productos repercute no sólo en el incremento en su valor, sino que además asegura la sanidad al llegar a los consumidores. Esto es esencialmente importante en los alimentos de origen animal, dada la complejidad de su composición y los costos que alcanzan, es por esto que se debe contar con procedimientos analíticos confiables, que permitan evaluar con precisión la calidad.

Durante la congelación disminuye el crecimiento microbiano, principal causante del deterioro de los alimentos cárnicos; también se reduce la velocidad de los procesos enzimáticos. Sin embargo otros procesos degradativos se ven propiciados, tal es el caso de la oxidación no enzimática de lípidos.

La oxidación de lípidos, también llamada rancidez oxidativa es uno de los procesos con mayor influencia en la degradación y pérdida de calidad en carnes y pescados. En almacenamiento y debido a la rancidez oxidativa, estos productos congelados sufren cambios en su sabor y aroma, así como disminución en su valor nutricional; más aún, se ha reportado que los productos de oxidación de lípidos son tóxicos, relacionándolos con enfermedades cardíacas, problemas vasculares cerebrales y cáncer en el hombre.

Las características sensoriales de la carne y el pescado congelados en almacenamiento se deterioran por la acción tanto de moléculas volátiles de bajo peso molecular como de moléculas de alto peso molecular como polímeros, que se forman a partir de los lípidos en estas condiciones. Esto da como consecuencia pérdidas enormes para quienes comercializan dichos productos, dado el rechazo de que son objeto. Por todo esto es importante detectar y monitorear estos compuestos durante el almacenamiento.

Un aspecto muy importante al trabajar en el deterioro de lípidos es la selección del disolvente de extracción, ya que la mayoría de procedimientos analíticos requieren los lípidos separados del resto de la matriz alimentaria. Los lípidos de los alimentos tienen estructuras muy variadas, al mismo tiempo su polaridad cambia de acuerdo a éstas; hay "lípidos polares", "lípidos neutros", que poseen diferencias de solubilidad en los disolventes, por esta razón existirán lípidos que no sean extraídos si el disolvente no es de la polaridad adecuada para el caso y por lo tanto se subestima el contenido de los mismos. Entonces al presentar los lípidos y los productos de oxidación estructuras complejas y adicionalmente los disolventes tener diferentes polaridades, la elección del disolvente se vuelve más difícil; aún más si se sabe que un procedimiento analítico no es aplicable a todas las matrices alimentarias.

Es por esto que resulta necesario establecer métodos válidos, considerando el efecto de los disolventes de extracción en los diferentes alimentos; así como también sería de suma importancia el contar con parámetros de calidad adecuados que permitan que los productos lleguen al consumidor en óptimas condiciones.

I. GENERALIDADES

I. 1. ACEITES Y GRASAS

A. Estructura general y composición.

Los lípidos junto con las proteínas y los carbohidratos constituyen los componentes estructurales mayoritarios de las células. A los ésteres de glicerol de los ácidos grasos se les ha llamado tradicionalmente grasas o aceites de acuerdo a su estado físico a temperatura ambiente.

En los alimentos los lípidos pueden estar separados de la matriz o formando parte constituyente de ella. Así también su composición, estructura cristalina, comportamiento en la fusión y la solidificación, su asociación con el agua y otras moléculas; son muy importantes en cuanto se refiere a la textura y propiedades funcionales que proporcionan a los alimentos.

Los lípidos simples son a menudo llamados "lípidos neutros" por su solubilidad en disolventes no polares, en tanto que los "lípidos complejos" o "polares" se refieren a fosfolípidos, glicolípidos y lipoproteínas¹¹⁰, que presentan regiones neutras y regiones polares.

Las grasas y aceites están compuestos principalmente por triglicéridos, el resto de componentes, fosfolípidos, esteroides y carotenoides⁷⁸ suman 5% o menos. En los triglicéridos predominan los ácidos grasos de 12 a 18 átomos de carbono, aunque en la leche

hay pequeñas porciones de ácidos grasos de cadena corta (C_4-C_8) y en los peces se encuentran ácidos grasos de 20 a 22 átomos de carbono. Los triglicéridos pueden tener ácidos grasos saturados o insaturados, a los insaturados les falta una molécula de hidrógeno en cada carbono unido por una doble ligadura y el número de dobles ligaduras varía.

El ácido graso más abundante en la mayoría de las grasas naturales es el oléico, representado (18:1), en donde el primer número indica el número de átomos de carbono y el segundo las insaturaciones, se encuentra en el aceite de coco en menos del 10% y en el de oliva en más del 80%. De los ácidos grasos saturados el más común es el palmítico (16:0) en aceites vegetales y el esteárico (18:0) es el mayor componente de las grasas animales⁷⁵.

B. Propiedades generales.

Las propiedades de las grasas se ven afectadas principalmente por los ácidos grasos que las componen.

En general son insolubles en agua y en solventes no acuosos, su solubilidad se incrementa con la insaturación de los ácidos grasos y baja cuando la longitud de la cadena de los ácidos grasos aumenta. La solubilidad también varía con la temperatura.

Otras propiedades son la fusión y solidificación y es importante la influencia del polimorfismo en ellas, cuando se encuentran puras.

Cuando se exponen al oxígeno del aire lo absorben en diferente proporción según el grado de insaturación, esto hace que se deterioren y aparezcan sabores y aromas a rancio.

Presentan susceptibilidad a hidrolizarse lo cual también las deteriora. Tienen la capacidad de hidrogenarse, en donde el doble enlace de los ácidos grasos insaturados se satura. También son susceptibles a interesterificación, con lo que se modifican sus propiedades funcionales.

C. Papel de los lípidos en la nutrición.

Los lípidos en la nutrición proporcionan una gran energía, aproximadamente 9.5Kcal/g. Incrementan la palatabilidad de los alimentos. Dan la sensación de saciedad en el estómago y hacen más prolongados los intervalos de alimentación.

También las grasas proporcionan un ácido graso esencial, el linoleico y contienen las vitaminas liposolubles A, D, E y K. El ácido linoleico se transforma en el cuerpo en ácido araquidónico, que es el precursor de un grupo de hormonas conocidas como prostaglandinas

35

D. Grasas animales.

Entre las funciones de las grasas en los tejidos animales, la de reserva energética es de las más importantes, éstas contienen grandes cantidades de ácidos grasos C16 y C18, cantidades intermedias de ácidos grasos insaturados, la mayor parte ácido oleico y linoleico, y pequeñas cantidades de ácidos grasos de cadena impar³⁵.

Los aceites de pescado tienen mayor cantidad de ácidos grasos poliinsaturados llegando a contar hasta con 6 dobles ligaduras⁷⁵.

FALTA PAGINA

No. 8
9 y

La extracción de lípidos con disolventes no polares remueve principalmente los triglicéridos almacenados en los glóbulos grasos del tejido adiposo, sin embargo para conseguir la extracción de los fosfolípidos y los lípidos asociados a proteínas del tejido muscular, se requieren mezclas de disolventes polares y no polares con lo cual se remueve hasta el 99% de los lípidos presentes en el tejido ³⁸.

B. Lípidos del músculo.

A diferencia de los triglicéridos del tejido adiposo, los lípidos musculares no están en glóbulos localizados dentro de las células sino que se hallan formando parte integral de estructuras celulares como: la pared celular, las miofibrillas, la mitocondria y los microsomas; esta grasa intracelular incluye a la mayoría de los fosfolípidos de los tejidos, otra parte está asociada con proteínas.

Conforman aproximadamente de 2-4% del total de los lípidos y por su composición son muy importantes en el proceso de oxidación ⁶⁹.

Los fosfolípidos de la grasa intramuscular contienen un alto porcentaje de ácidos grasos insaturados; en la tabla 3. se observa que el porcentaje de fosfolípidos con ácidos grasos con 2-3 dobles ligaduras es del 25.2 y el porcentaje de fosfolípidos con ácidos grasos con 4 o más dobles ligaduras es de 19.2. Si se considera que los ácidos grasos insaturados son más susceptibles de sufrir deterioro, principalmente de tipo oxidativo los lípidos de la porción magra tendrán un papel importante en la calidad de la carne.

En la tabla 3. se presenta la composición de los lípidos de la carne de res magra.

Tabla 3. Composición de los lípidos de la carne de res magra ⁷⁹

<i>FRACCION LIPIDICA</i>	<i>CARNE DE RES</i>
Triglicéridos	2-4 (%)
Fosfolípidos	0.8-1(%)
Ácidos grasos con 2-3 dobles ligaduras	
% en triglicéridos	6.1
% en fosfolípidos	25.2
Ácidos grasos con 4 o más dobles ligaduras	
% en triglicéridos	0.1
% en fosfolípidos	19.2

Cabe mencionar que aparentemente el incremento de la cantidad de grasa en la carne puede bajo ciertas condiciones reducir la intensidad de los olores a rancio ya que atrapa a los productos de degradación volátiles, por esta razón no resulta raro el hecho de que los olores rancios puedan ser más intensos en las carnes magras que en las grasosas ¹⁴².

C. Cortes de carnes.

En las reses, la grasa se deposita en el tejido conectivo dentro del músculo, alrededor y entre los músculos, debajo de la piel, en tejido conectivo especial que tiene células que almacenan glóbulos de grasa y alrededor de los órganos en la cavidad abdominal.

Comercialmente los cortes de carne tienen diferentes nombres, tenemos rib (lomo alto), loin (lomo bajo), sirloin (lomo bajo o solomillo), leg o ham (pierna), etc ²⁴, los cuales tienen un contenido de grasa mayor o menor según su localización, los tejidos que no están sujetos a mayor actividad física son los que generalmente tienen más grasa.

En la tabla 4. se presentan algunos cortes de res con su composición.

Tabla 4. Composición de los canales de carne de res³⁰.

<i>Corte</i>	<i>Agua (%)</i>	<i>Proteína (%)</i>	<i>Grasa (%)</i>
Magra	74	20.3	4.6
Grasa	24	8.8	66.9
Carne de pecho	62.2	16.8	20.5
Costillas	57.4	16	25.1
Picada	64.5	18.8	16.2
Rabadilla	66.7	18.9	13.5
Solomillo	59.4	16.6	22.8
Pulpa	68.7	20.2	10.6
Costado de pierna	68.4	19.6	11.2

El sirloin está ubicado en la parte final del lomo de la res, cerca de la pierna, está rodeado por una capa gruesa de grasa y además tiene un alto porcentaje de grasa intramuscular.

Los músculos rojos contienen más lípidos que los blancos.

L 3. LIPIDOS EN PRODUCTOS MARINOS

Los lípidos de estos productos contienen gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, hasta con 6 dobles ligaduras y son generalmente ricos en vitaminas A y D.

Son más susceptibles a la oxidación principalmente por la clase de ácidos grasos presentes, dado que éstos son altamente insaturados.

A. Lípidos del pescado.

Para fines comerciales se clasifica a los peces según su contenido de grasa en: magros, a los que tienen 4% o menos, por ejemplo el bacalao; los que tienen entre 4 y 8% son

medianamente grasos, como la carpa; y los que tienen más de 8% son los grasos, como el salmón, la sardina, etc ⁷⁵.

La distribución de grasa en el cuerpo depende de si son magros o grasos. En los magros la grasa está localizada especialmente en el hígado y en otros órganos internos o en la cavidad abdominal cerca de los órganos internos en forma de depósitos de grasa; en los grasos está localizada entre la carne como tejido adiposo o en capas subcutáneas, es decir por debajo de la piel.

Los peces tienen una alta proporción de lípidos neutros, la cual varía con la especie ^{46, 69}. En pescados magros con 0.5-1.1% de grasa el 65% de los lípidos se encuentran intracelularmente como fosfolípidos ligados a proteínas del músculo; el restante 35% son lípidos neutros. Los pescados grasos tienen depósitos de grasa en el músculo y la proporción de lípidos neutros es alta. En los pescados semigrasos casi el 75% del total de lípidos está constituido por lípidos neutros ⁶⁹.

I. 4. AUTOOXIDACION DE LIPIDOS

En general la autooxidación se define como la reacción de cualquier material con el oxígeno ⁷⁹.

La oxidación de lípidos es la principal causa de deterioro en los alimentos siempre y cuando otras reacciones deteriorativas como las microbianas y las enzimáticas estén controladas por medio de bajas temperaturas, por ello es de gran interés económico para la industria de los alimentos. Origina disminución de la calidad nutricional de los alimentos, además en estudios

recientes se ha involucrado a algunos productos de la oxidación de lípidos con toxicidad en el hombre ³⁵.

Los hidroperóxidos derivados de la oxidación de lípidos se han relacionado recientemente con el proceso del envejecimiento y con algunas enfermedades ¹³².

En un alimento pueden oxidarse espontáneamente la mayoría de los lípidos, fenoles, aminas y sulfitos inorgánicos, si hay las condiciones favorables para ello, como son exposición a oxígeno, elevadas temperaturas, presencia de catalizadores, etc.

En un sistema complejo como lo es un alimento hay varios factores que considerar, por ejemplo, están presentes enzimas y catalizadores que aceleran la reacción o también inhibidores y condiciones físicas de protección, o todo a la vez, lo que hace que sea imposible saber el curso que tomará la reacción.

La oxidación de pequeñas cantidades de lípidos susceptibles presentes en los alimentos es tan problemática como el tener un alimento graso ⁷⁹.

En la autooxidación de lípidos hay varios factores involucrados:

a) Principalmente intervienen grupos acilo insaturados y el grupo hidroperóxido aparece en posición α con respecto a la doble ligadura. Dependiendo de la cantidad de grupos acilo insaturados y otros factores, pueden o no formarse los hidroperóxidos a partir de grupos con dobles enlaces u otros.

b) Comúnmente para ácidos grasos y derivados, la velocidad de oxidación es mayor dependiendo sobre todo del grado de insaturación de los ácidos grasos. Los derivados de ácidos grasos saturados se autooxidan para formar hidroperóxidos, pero en condiciones ordinarias la reacción es muy lenta.

c) Tratándose de alimentos hay varios factores que influyen: pro-oxidantes, trazas de metales y catalizadores biológicos que aceleran la reacción, al igual que la radiación sobre todo la infrarroja y la visible.

Hay infinidad de sustancias que aceleran o detienen la reacción. La presencia del hierro de la hemoglobina en los músculos oscuros del pescado puede acelerar la rancidez oxidativa en los productos congelados³⁷.

Estos factores se explican detalladamente más adelante.

d) La temperatura tiene un efecto muy grande sobre la velocidad de oxidación, ésta aumenta al aumentar la temperatura. Sin embargo, a temperaturas de -18°C a -26°C los ácidos grasos poliinsaturados se oxidan fácilmente¹²².

e) La mayoría de productos formados son hidroperóxidos, pero hay también muchos productos secundarios.

f) Los hidroperóxidos no tienen mayor contribución a los aromas y sabores de los alimentos oxidados, más bien lo hacen los productos de oxidación secundaria⁷⁹.

g) Un factor importante que puede influir en la oxidación de lípidos es la actividad de agua, cuando ésta se halla en los más altos valores o cuando decrece mucho, la oxidación se incrementa, debido a que cuando hay una buena hidratación o cuando la cantidad de agua es muy reducida los metales presentes y los radicales libres se vuelven más activos, hay mayor movilidad, las reacciones de estos elementos se ven favorecidas, etc⁷⁰.

A. Mecanismo de la autooxidación de lípidos.

Con el estudio de la oxidación del etil linoleato se lograron aclarar varias dudas y se formuló un posible mecanismo de reacción.

Se ha establecido que:

- La oxidación es una reacción en cadena en la que intervienen radicales libres ya que puede ser inhibida con cantidades mínimas de antioxidantes antes de que se inicie la oxidación.
- La reacción es similar a ciertas reacciones en cadena de compuestos inorgánicos.
- Por espectrofotometría se observaron cambios a nivel de los dobles enlaces y formación de hidroperóxidos; las dos cosas sugieren que hay radicales libres involucrados.
- Se observa descomposición de hidroperóxidos.

El deterioro oxidativo de los lípidos de alimentos involucra, primero reacciones oxidativas, acompañadas por reacciones secundarias que pueden ser oxidativas o no. La fase primaria ha sido bien explicada sin embargo de la fase secundaria se sabe muy poco.

Los productos de la oxidación primaria son hidroperóxidos.

Hay tres fases en el proceso de autooxidación:

a) Iniciación: en esta etapa lo más importante es la formación de radicales libres. Puede ser catalizada por metales o por radiaciones.

Un átomo de hidrógeno es eliminado de un átomo de carbono metilénico, generalmente adyacente a un doble enlace del ácido graso, dando como resultado un radical libre. Como la reacción entre el O_2 y el ácido graso es termodinámicamente difícil (35kcal/mol), se requiere la producción de varios radicales libres para iniciar la propagación.

b) Propagación: la formación de radicales libres se mantiene y se dan una serie de reacciones adicionales.

Los radicales libres formados en la primera etapa reaccionan con O_2 , para dar origen a radicales hidroperóxido. Estos nuevos radicales son capaces de aceptar átomos de hidrógeno de otras moléculas, para producir hidroperóxidos y nuevos radicales libres. Debido a la resonancia para estabilizar las especies $R\bullet$, la secuencia de la reacción está acompañada por un movimiento de los dobles enlaces, resultando en la formación de hidroperóxidos isoméricos que generalmente contienen dienos conjugados, raros en las grasas no oxidadas.

c) Terminación: los radicales libres empiezan a combinarse, en esta etapa el daño por oxidación es extenso.

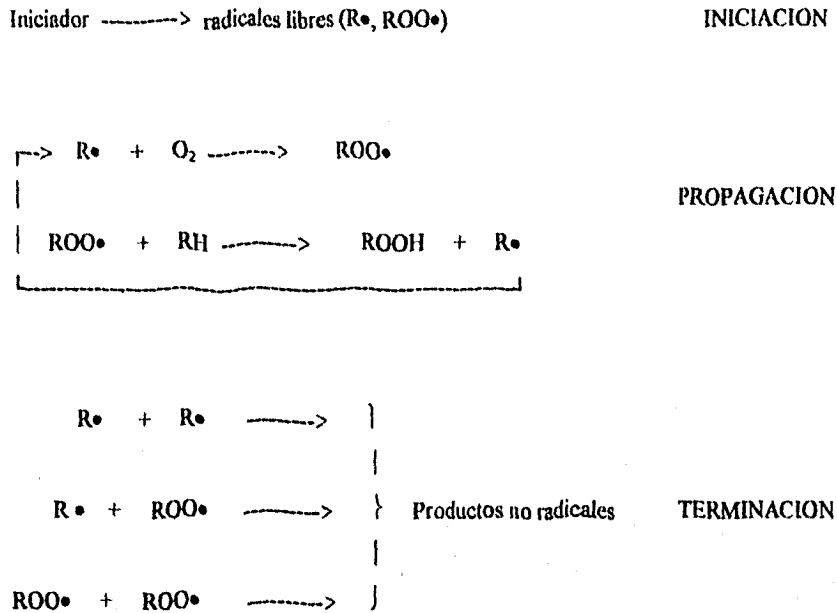
Los radicales libres interaccionan entre sí para dar origen a compuestos no radicales.

Los hidroperóxidos son compuestos inestables que se descomponen para producir más radicales libres y productos de menor peso molecular como ácidos de cadena corta, alcoholes, aldehídos, cetonas, hidrocarburos, etc.⁷⁸

Adicionalmente, en esta etapa los compuestos generados incluyendo a los radicales libres, son capaces de reaccionar entre sí para producir compuestos diméricos y poliméricos.

El la fase (a) la presencia de aromas es mínima, en la (b) se aprecia un marcado deterioro del aroma y el sabor, la última fase no afecta apreciablemente al desarrollo de la rancidez¹¹³.

De manera muy general se presentan las tres etapas de la autooxidación de lípidos⁷⁹, así:



B. Productos secundarios de degradación.

Se forman por degradación de los hidroperóxidos. Se les llama así a todos los compuestos no-radical generados en la oxidación de lípidos. Considerando la gran variedad de ácidos grasos insaturados presentes en la grasa de un alimento, los productos secundarios de la oxidación son igualmente muy variados, lo que hace complicado su análisis; adicionalmente los alcoholes, aldehídos y el resto de compuestos resultantes son también susceptibles a oxidarse.

A estos compuestos se les ha relacionado con reacciones con otros compuestos, de tal forma que afectan sus propiedades funcionales, como en el caso de las proteínas, que modifican su capacidad de retención de agua y su poder emulsificante ^{24,122}.

C. Oxidación con oxígeno singlete.

Como se explica anteriormente, la principal vía de oxidación de los ácidos grasos insaturados involucra un mecanismo por radicales libres que actúan de manera autocatalítica. Sin embargo es difícil explicar el origen de los radicales libres iniciales, es poco probable que sea mediante el ataque directo del oxígeno en su forma estable (estado triplete) a los dobles enlaces de los ácidos grasos (RH), ya que los enlaces C=C de los RH y ROOH están en estado singlete por lo que esta reacción no obedecerá a la ley de conservación del spin. Por lo dicho, la reacción se explicaría si el oxígeno singlete ($^1 O_2$), una de las formas más activas en el deterioro fotooxidativo, sea el responsable de la iniciación.

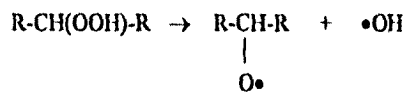
Puesto que los electrones están cargados, actúan como si fueran imanes y pueden orientarse de dos formas diferentes, las que se atribuyen valores de +1 y -1. Si el átomo de oxígeno, tiene dos electrones desapareados en su orbitale externo, estos pueden alinearse el uno respecto al otro en forma paralela o antiparalela, denominadas respectivamente estado triplete o singlete. En el estado singlete, los dos electrones tienen spines opuestos y por lo tanto la repulsión electrostática es grande, dando un estado excitado, pudiendo reaccionar más rápidamente (como 1500 veces más rápido que el oxígeno triplete), con zonas de densidad electrónica alta, tales como los enlaces C=C.

En los alimentos que contienen grasas existen frecuentemente sustancias que pueden actuar como fotosensibilizadores y producir oxígeno singulete, entre las que están los pigmentos naturales, como la clorofila, algunas porfirinas, la hemoglobina y la mioglobina. La eritrosina, un colorante sintético es también un fotosensibilizador ³⁵.

D. Descomposición de hidroperóxidos.

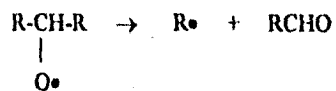
En un esquema presentado por Badings ⁷ se visualizan uno a uno los pasos de éste proceso.

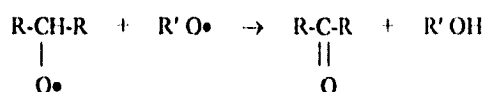
El primer paso es la descomposición a los radicales alcoxy e hidroxy.



El radical alcoxy puede dar las siguientes cuatro reacciones:

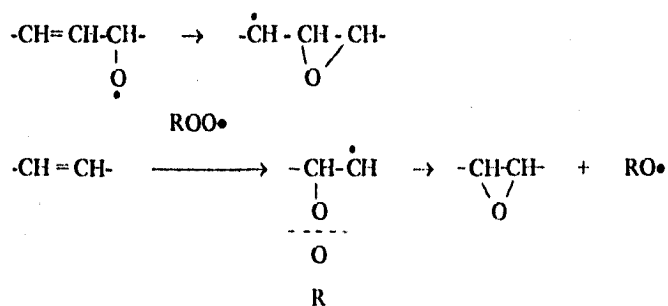
- Puede descomponerse por una fisión para formar un aldehído y otro radical





- Hay muchas otras reacciones de oxidación secundaria como la formación de epóxidos y de polímeros, etc. cuyo mecanismo no está muy claro ⁷⁹.

La reacción de los radicales alcoxi y peroxi con los dobles enlaces da lugar a la formación de epóxidos ³⁵, a continuación la reacción:



E. Pro-oxidantes

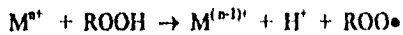
Los metales de transición, particularmente los que poseen dos o más estados de valencia con un potencial de óxido-reducción adecuado por ejemplo, cobalto, cobre, hierro, manganeso y níquel, son los principales pro-oxidantes; su presencia incluso a concentraciones inferiores a 0.2ppm disminuye el periodo de inducción y por lo tanto aumenta la velocidad de oxidación.

La mayoría de aceites comestibles contienen trazas de metales pesados, ya sea que provienen del suelo donde creció la planta o por contaminación de los equipos de

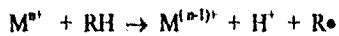
procesamiento o almacenamiento. En los tejidos y fluidos biológicos (leche, zumos de fruta, huevos) hay de forma natural trazas de ellos en forma ligada o libre ³⁵.

Algunos de los mecanismos propuestos para explicar la catálisis por metales son ³⁵:

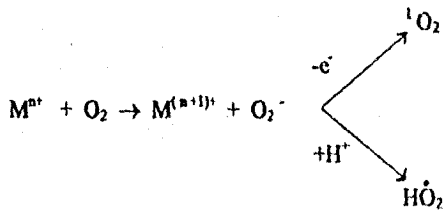
- Aceleración de la descomposición de los hidroperóxidos:



- Reacción directa con el sustrato no oxidado:



- Activación del oxígeno molecular para dar oxígeno singulete y radicales peróxido.



I. 5. PRESERVACION DE LOS ALIMENTOS

A. Refrigeración y congelación de carne y pescado.

Hace mucho el hombre descubrió que la carne de un animal se dañaba rápidamente si se la dejaba al ambiente, por lo que buscó procesos para conservarla basados principalmente en la disminución de la temperatura de almacenamiento.

Los factores involucrados en la tecnología del congelamiento de la carne y el pescado son en verdad complicados, por ejemplo se sabe que el congelamiento rápido de carnes que están en rigor mortis causa marcada contracción en los músculos y en cambio el congelamiento muy lento puede hacer que se produzcan malos olores en los huesos debidos generalmente a crecimiento microbiano.

La conservación del pescado mediante congelación se ha practicado desde finales del siglo XVIII. En la actualidad grandes cantidades de carne son congeladas previamente deshuesadas o cocidas y luego consumidas como tal o usadas para la fabricación de otros productos. Si el músculo es congelado antes de que el contenido de Adenosín Trifosfato haya decaído en el rigor mortis, una rápida actividad de la Adenosín Trifosfatasa convierte el Adenosín Trifosfato en Adenosín Difosfato dando como resultado el acortamiento de los músculos y la pérdida de fluidos al descongelar, este efecto es mayor en los cortes sin hueso ya que en los que conservan éste los músculos se conservan extendidos⁷⁵.

El pescado empacado correctamente en hielo puede durar por 10 días pero el tiempo requerido para que llegue éste a los consumidores es generalmente mayor por lo que se hace necesaria la aplicación de toda una tecnología de la congelación que permita que el pescado conserve sus cualidades de textura, olor, sabor, etc.

En carnes y pescados almacenados por largos períodos en congelación y aparte de la posible descomposición por microorganismos, se produce deterioro en la textura, el sabor y el color, principalmente cuando la congelación es deficiente; los cambios en la textura se dan especialmente por desnaturalización de proteínas principalmente miofibrilares y por deshidratación de la superficie; los cambios en sabor y aroma se presentan por formación de sustancias de estructura química muy variada en la oxidación de lípidos ¹²².

La desnaturalización de proteínas se produce por varios factores relacionados con cambios en el contenido de agua en los tejidos, con la actividad enzimática de la enzima TMAOasa (trimetilaminoxidasa) y por factores relacionados con cambios en lípidos ¹²².

El pescado y la carne se componen en su mayor parte de agua (60 a 80%), pero debido a que poseen sales y otras sustancias químicas en solución, se comienzan a congelar alrededor del 1°C, conforme baja la temperatura el agua se cristaliza y la solución líquida restante se concentra tanto en sales como en enzimas; el agua congelada en forma de cristales de hielo se deposita dentro de las células musculares, dichos cristales tienen diferentes formas, mismas que dependen sobre todo de la velocidad de congelamiento.

La velocidad de congelación es muy importante, se ha visto que se puede causar daño en las carnes y pescados, tanto con congelación lenta, como con congelación rápida.

La congelación rápida forma mayor cantidad de cristales y más pequeños, una congelación lenta los hace grandes pero menos numerosos y una congelación más lenta hace que se formen cristales grandes no sólo en las células, sino también entre sus paredes, produciendo que éstas se rompan.

La congelación no tiene lugar de una manera uniforme, mientras la superficie de la carne o el pescado se congela, la parte central no lo hace; no se considera congelada una pieza si la parte del centro no alcanza por lo menos -5°C , sólo allí el 80% del agua se ha congelado. Cerca del 5% del agua en el pescado permanece líquida a -40°C .

Al inicio de la congelación el enfriamiento es lento porque debe extraerse primero el calor latente de solidificación, este periodo de $0-5^{\circ}\text{C}$ es conocido como "rango crítico" pues en este lapso el pescado y la carne pueden sufrir daño por incremento de la actividad autolítica; la congelación deja un remanente de agua en estado líquido y con alta concentración de sólidos y enzimas en solución, a -4°C la actividad de las enzimas no se ve afectada más aún, como están con un medio favorable, su actividad se incrementa. A partir de los -5°C la actividad enzimática disminuye y a partir de -30°C es sumamente lenta.

La desnaturalización, al igual que la autólisis, es un proceso irreversible que causa daño en la estructura y en la composición química de la proteína, depende de la temperatura y de la duración del almacenamiento. La velocidad de desnaturalización es mayor entre 0 y -5°C , pero todavía a -10°C se da y las carnes y pescados duran pocas semanas a ésta temperatura.

Los lípidos durante la congelación tienen diferentes efectos sobre las proteínas; los lípidos no oxidados, según algunos autores, presentan un efecto de protección sobre las proteínas en congelamiento, debido a que disminuyen la acción de los ácidos grasos libres compitiendo

con ellos por sitios de enlace de las proteínas, otra hipótesis indica que los lípidos cumplen con la función protectora con las proteínas por dilución de la concentración de solutos que se encuentra incrementada en congelación; además se les atribuye un efecto sinérgico de crioprotección cuando están presentes polifosfatos o azúcares, debido a que se observa disminución en la pérdida de agua en las carnes cuando se descongela y mejora en la textura de estas muestras. Por otro lado los lípidos no oxidados tienen también efecto nocivo sobre las proteínas en congelación, al ponerse en contacto con éstas debido a la acción de los cristales de agua que rompen compartimientos antes separados, los lípidos pueden formar complejos no convencionales con las proteínas derivando esto en cambios de textura del tejido muscular¹²².

La oxidación de lípidos acorta la vida de anaquel de carnes y pescados, es importante además porque los productos resultantes de ella causan cambios en las propiedades nutricionales y funcionales de las proteínas por interacción con éstas.

En congelación los productos de oxidación de lípidos dan a los tejidos características indeseables, causan pérdida de amino ácidos como Lys, Cys, Hys, Met, etc., y son los responsables de la pérdida de color por daño en pigmentos tales como la mioglobina, por la formación de complejos lípidos oxidados- proteínas, el mecanismo de esta reacción no está aclarado aún pero hay algunas hipótesis, una primera dice que los radicales libres procedentes de la peroxidación de lípidos pueden tomar hidrógeno de las partes lábiles, por ejemplo de los grupos -SH de la cadena de proteína y dar como resultado polímeros solubles en agua e insolubles en ella. La segunda hipótesis dice que productos estables de la oxidación de lípidos tales como compuestos carbonilo, por ejemplo malonaldehído, propanal

y hexanal, pueden reaccionar covalentemente con proteínas, principalmente con los siguientes grupos: el -SH de la cisteína, el ϵ -amino de la lisina, el grupo amino terminal de tirosina, metionina, aspártico y arginina, causando pérdida en la solubilidad de la proteína por incremento de la hidrofobicidad ¹²²

La deshidratación es pérdida de humedad en la superficie causada por la diferencia de contenido de humedad entre el aire que rodea a la carne y al pescado y el aire de la cámara de enfriamiento. Produce cambios en la apariencia y textura y además acelera la oxidación de lípidos y la desnaturalización de proteínas.

Durante la congelación se eleva el número de ácidos libres provenientes de la hidrólisis enzimática y no enzimática de lípidos, sobre todo fosfolípidos, lo cual tiene gran influencia en la desnaturalización de proteínas, observándose un marcado descenso en la solubilidad de las mismas. La interacción de los ácidos grasos libres con las proteínas depende de su concentración, del grado de insaturación de éstos y del tiempo de almacenamiento ¹²².

Ante la gran cantidad de cambios que ocurren en el proceso de congelación este se vuelve de gran importancia comercial, ya que determinarán la vida de anaquel de un producto; el deterioro de la carne y el pescado es mayor cuando se tienen prácticas pobres de congelamiento o cuando la calidad de estos productos es baja. Los principales criterios para conseguir mejores métodos de congelación son: en el caso del pescado, congelación desde el sitio de la pesca en el mar; velocidad de congelación elevada; estudiar las ventajas y desventajas de los diferentes métodos de congelación según el caso; determinar la calidad del producto en caso de fluctuaciones de humedad o temperatura; estudiar la efectividad de tratamientos anteriores a la congelación, como inactivación de enzimas, adición de

antioxidantes o agentes crioprotectores y la importancia del empaque (relacionado con vapor de humedad y permeabilidad al oxígeno) ¹²².

I. 6. TECNICAS PARA ANALISIS DE RANCIDEZ OXIDATIVA

A. Métodos químicos.

1. Determinación del Valor Peróxido.

Se han desarrollado numerosos métodos para determinar los productos primarios del deterioro oxidativo, todos ellos bajo el nombre de "procedimientos para determinación del índice de peróxidos"; los resultados de los análisis dependen de las condiciones de la reacción y sobre todo del agente reductor usado.

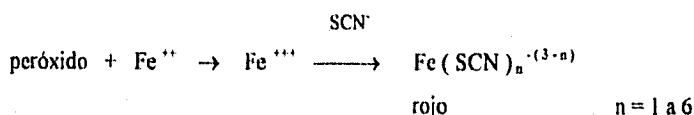
Se usan generalmente métodos con indicadores de oxido-reducción como: las volumétricas con yodo y las colorimétricas con sales ferrosas. Este método requiere de la extracción previa de los lípidos.

La técnica yodométrica es la más usada, ha sido muy criticada porque se argumenta que da valores bajos debido a que se puede presentar liberación de yodo del yoduro de potasio por el oxígeno presente en la solución que va a titularse ⁴⁴.

Otras causas de error que han establecido para el método yodométrico, incluyen variación en el peso de la muestra, tipo y grado del disolvente usado debido a la diferencia en la polaridad y variaciones en el tiempo y en la temperatura de reacción⁴⁴.

En un trabajo hecho por Lea⁷² en el que se oxida linoleato a 37°C se reporta que el método yodométrico corresponde sólo al 91% del oxígeno absorbido, (posiblemente porque ya una parte estará formando parte de aldehídos u otros compuestos que posean oxígeno).

Por otro lado el método de Stine *et al.*¹²⁰ mide la intensidad del color debido a la formación de un complejo de tiocianato férrico; es rápido, requiere muy poca muestra, además, es bastante sensible y reproducible, a continuación la reacción⁴⁴:



Según un estudio de G. Barthel y W. Grosch⁸, si el método de Stine *et al.*¹²⁰ se compara con la técnica yodométrica de Lea⁷², se observa una estequiometría diferente, pues mientras en la primera la reducción con Fe²⁺ transfiere aproximadamente cuatro electrones por cada peróxido, la técnica yodométrica transfiere dos⁸.

Además comparando estas dos técnicas, según el mismo autor, en la de Stine *et al.* los peróxidos consumen más o menos el doble de equivalentes de reducción o sea de Fe²⁺; en contraste si se usa un estándar de H₂O₂ sólo necesita dos equivalentes tanto de yodo como de hierro; el incremento en el caso de los productos de oxidación de lípidos podría ser debido a que se producen reacciones adicionales con sistemas aromáticos y con moléculas con dobles enlaces⁸.

Se ha reportado que el método que usa hierro es el más sensible de los fotométricos para determinación de autooxidación ¹³⁵, el único problema de este método es su aún no explicada estequiometría ¹³⁵.

Hay que tener muy en cuenta que los peróxidos llegan a una concentración máxima en un periodo corto y luego bajan ⁷⁹ ya que se descomponen dando lugar a otros compuestos estructuralmente diferentes, sin embargo es importante su determinación porque son los productos mayoritarios en la oxidación primaria de lípidos.

Para cuando los peróxidos ya no se encuentren presentes y no se tenga datos sobre el estado del producto, se recomienda hacer una prueba de TBA ¹³⁵, eso indicará si está oxidado a pesar de que no se detecten hidroperóxidos.

Siempre que se exprese el deterioro de un alimento en términos del valor peróxido se debe especificar el método utilizado ⁴⁴.

2. El Índice de TBA.

Este método es de los más comúnmente usados para determinación de deterioro de lípidos por su alta reproducibilidad ⁴⁴.

Este análisis puede realizarse de diferentes maneras, directamente en la matriz alimenticia, en un destilado de la misma o en la grasa extraída.

Los índices de TBA obtenidos usando métodos de destilación son aproximadamente 2.6 veces mayores a los obtenidos por métodos de extracción de malonaldehído en frío, según Witte *et al.* ¹⁴⁵; el calor usado en la destilación puede incrementar las cantidades de aldehídos y modificar ciertas reacciones de los productos carbonilo formados, además

incrementar el proceso oxidativo, dando como resultado índices de TBA altos ¹¹⁵. Sin embargo el hecho de trabajar con la muestra directamente puede ocasionar también resultados erróneos pues hay algunas sustancias, como la sacarosa por ejemplo, que reaccionan con el TBA y dan complejos que presentan absorción a la misma longitud de onda ⁴⁴, también pueden causar interferencia pigmentos presentes en las carnes curadas y la dispersión de los lípidos en el extracto ¹¹⁹. También se atribuyen resultados pobres al método directo, cuando se trabaja con aceites, debido al sistema de dos fases que se forma lo que no permite una reacción completa ⁴⁴.

Tarladgis *et al.* ¹³⁰ descubrieron que el TBA es inestable frente a los ácidos, a los peróxidos y al calor, que es como generalmente se desarrolla el procedimiento, dándose lugar a productos de degradación que absorben a igual longitud de onda que el complejo TBA-MA. Ellos idearon un proceso en el cual un extracto acuoso del alimento o una emulsión de la grasa reaccionan con TBA y se incuban 15 horas, a temperatura ambiente y sin ácido ⁷⁸.

El índice de TBA no tiene buena correlación con las pruebas sensoriales ⁷⁹.

Algunos autores cuantifican el malonaldehído luego de la separación del complejo formado con ácido tiobarbitúrico, usando HPLC o cromatografía de gases ¹¹⁰.

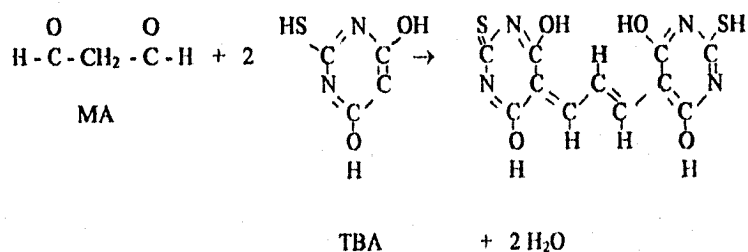
El mecanismo por el cual se forma malonaldehído en la oxidación de lípidos no está aclarado, teóricamente puede ser por un derivado de los peróxidos formados con un grupo pentadieno, seguido de un rompimiento o de una futura oxidación de los dobles enlaces producidos por la fisión de monohidroperóxidos ²⁷.

El malonaldehído (MA) es uno de los productos de oxidación secundaria más abundantes (ver mecanismo de formación en la pag. 21). Puede reaccionar con compuestos como amino

ácidos, proteínas, ácidos nucleicos y muchos otros compuestos de ese tipo, reacciona con el grupo amino y mediante aminación reductiva se convierte en amina ⁹². Está reportado que éste compuesto puede estar involucrado en la formación de pigmentos en la vejez, además ciertos estudios indican que es carcinogénico en ratas, altamente mutagénico para algunas cepas de salmonella y citotóxico y mutagénico para células de mamíferos ¹¹⁴.

Este método es particularmente usado para alimentos con alto contenido de lípidos insaturados, aunque se usa con éxito en lácteos los cuales tienen un bajo contenido de éstos ⁷⁹.

El pigmento que se mide espectrofotométricamente es el resultante de la unión de 2 moléculas de ácido tiobarbitúrico y una de malonaldehído ⁷⁹. La reacción es la siguiente:



El complejo formado por malonaldehído y ácido tiobarbitúrico (TBA) es idéntico al formado por el ácido tiobarbitúrico y el 1,1,3,3-tetraetoxipropano lo que hace posible usar éste como patrón; el 1,1,3,3-tetraepoxipropano en medio ácido se hidroliza en dos moléculas de malonaldehído ¹²³.

A pesar de ser un método con muchas interferencias consideré importante incluirlo en el estudio sobre todo por la importancia que ha tomado el malonaldehído como producto

secundario de degradación en la oxidación de lípidos, en el aspecto de toxicidad para el ser humano, reportes bibliográficos, algunos de los cuales hago referencia dan cuenta de los descubrimientos sobre este tema.

3. Medición de Productos Carbonilo Totales y Volátiles.

Los compuestos carbonilo (aldehídos y cetonas, como por ejemplo, heptanal, octanal, butenal, etc) son un producto de la degradación secundaria de los peróxidos previamente formados¹⁰.

Los carbonilos no volátiles de alto peso molecular están presentes en mayores concentraciones que los carbonilos volátiles, pueden ser medidos por distintos métodos. La sustancia más usada para determinar estos compuestos es la 2-4, dinitrofenilhidrazona, con la que forman hidrazonas³⁵.

Los valores encontrados por este método no son muy exactos, pues reaccionan parcialmente los peróxidos; probablemente se da también descomposición de los carbonilos insaturados en medio ácido y con catalizadores⁷⁹.

Otros métodos como el de Holm³⁷ miden compuestos aldehídicos insaturados; éstos muestran buena correlación con olores a rancio; estos métodos usan benzidina.

Para determinar los carbonilos volátiles se usan métodos que recuperan esos compuestos de grandes cantidades de muestras muy oxidadas generalmente por destilación a baja presión o al vacío en aire o en atmósfera inerte.

El bisulfito de sodio también usado, extrae sólo aldehídos mayores a 18 carbonos con menor recuperación de aldehídos de alto peso molecular y cetonas⁷⁹.

La anisidina (p-metoxianilina) también ha sido utilizada en el análisis de productos carbonilo pero al igual que la benzidina son carcinogénicas, por lo que se ha restringido su uso ⁴⁴.

Lea y Swoboda ⁷³, reportan que por destilación al vacío obtienen recuperación cuantitativa de los aldehídos alifáticos de 16-18 carbonos, pero que los de menor peso molecular se pierden en parte o completamente. La recuperación mejora si la temperatura es de 49°C. A pesar de las condiciones leves de la reacción hay rompimiento de algunos precursores inestables de compuestos carbonilo volátiles.

4. Índice de Kreis.

Involucra la producción de un color rojo cuando reaccionan el floroglucinol con sustancias producidas en la oxidación de lípidos en medio ácido. Se cree que las sustancias responsables de esa reacción son epoxi aldehídos (ver mecanismo de formación en la pag. 22) o sus acetales ⁴⁴.

Patton *et al.* ¹⁰¹ presenta evidencia de que es el aldehído epihidrina (2,3-epoxipropanal) el responsable de la coloración, aunque sugiere que el malonaldehído también puede reaccionar dando positiva la prueba de Kreis ⁴⁴.

La mayor objeción a este método es, que la producción de color no es paralela con el desarrollo de la rancidez, es más hay estudios en los que muestras frescas dan índices de Kreis positivos ⁴⁴.

Al igual que el valor de anisidina, el índice de Kreis no es muy sensible y además es muy inespecífico ¹³³. Se debe disponer de la grasa separada de la matriz alimenticia para poder aplicarlo.

En la actualidad hay varias pruebas químicas que pueden ser usadas para el análisis de rancidez oxidativa, pero con sus limitaciones, ya que no hay una prueba que por sí sola corresponda a un grado definitivo de rancidez, dado que durante el proceso de oxidación se producen compuestos muy variados, en diferentes tiempos; los métodos analíticos que generalmente se utilizan para evaluar el deterioro, son específicos para detectar algunos de los compuestos formados, lo que complica la interpretación de los resultados.

Entre las pruebas más utilizadas están: el índice de peróxidos ^{61, 89, 138}, el índice de TBA ^{21, 34, 39, 62, 63, 82, 89, 116, 120}, la determinación de los productos carbonilo ¹³⁸ y otras.

Ultimamente se usan otras pruebas para medir el deterioro de los lípidos, entre esas está: análisis de compuestos volátiles por cromatografía de gases ³⁹.

Las pruebas aceleradas son una alternativa cuando lo que se requiere es un análisis de la estabilidad de un producto, luego de someter al producto a una oxidación controlada se utiliza la medida del Índice de Peróxido para su evaluación.

El método del "Oxígeno activo" (AOM), es un método rápido para análisis de estabilidad; la prueba usa alta temperatura y aereación ¹¹³.

Los métodos utilizados para medir índices de oxidación en este trabajo se seleccionaron luego de probar algunas de las técnicas descritas en la bibliografía de acuerdo a las ventajas que presentaron.

A) El método del Índice de TBA:

- Es rápido.

- Se realiza de manera directa con la muestra fresca.
- Presentó reproducibilidad y repetibilidad.

b) El Índice de Peróxido

Método de la AOAC: se realizó para comparar nuestros parámetros con un método oficial.

Método Colorimétrico:

- Requiere una mínima cantidad de muestra
- Es muy rápido
- Tiene alta sensibilidad
- Presentó reproducibilidad y repetibilidad

c) Índice de Kreis:

- Es rápido
- Presentó reproducibilidad y repetibilidad

B. Métodos físicos.

I. Fluorescencia.

Este método es muy utilizado para análisis de daño por oxidación en tejidos biológicos.

La formación de cromógenos fluorescentes se los atribuye a la reacción de un grupo amino con compuestos carbonilo, principalmente malonaldehído, el método es muy sensible puede detectar productos fluorescentes hasta en una cantidad de un parte por billón y se ha visto que es de 10 a 100 veces más sensible que el índice de TBA⁴⁴.

Terto *et al.*¹³² utilizan un ensayo fluorométrico para medir hidroperóxidos en carnes y pescados, en la reacción catalizada por una enzima, una peroxigenasa, los hidroperóxidos son reducidos a una cantidad equimolecular de alcohol durante la hidroxilación del sustrato, 1-methyl indol; la técnica no requiere extracción de lípidos.

2. Espectroscopía infrarroja.

El análisis por espectroscopía infrarroja es válido para reconocer grupos funcionales inusuales. Como los compuestos formados en la oxidación de lípidos sufren cambios, es posible usar este método para seguir el curso de la reacción. O'Connor⁹⁵ reporta la aparición de bandas aproximadamente a los 2.93 μ indicando la formación de hidroperóxidos y la aparición de otras bandas correspondientes a otros grupos.

3. Cromatografía de gases.

La cromatografía de gases es muy usada en la separación e identificación de los productos de la oxidación de lípidos en muestras puras como lo son los aceites vegetales por ejemplo, pero cuando se trata de sistemas de lípidos más complejos como lo son los alimentos, la identificación y la estandarización se dificultan⁴⁴.

Para la aplicación de este método los compuestos a analizar deben ser volátiles o si no lo son deben ser susceptibles a volatilizarse por procedimientos previos.

Algunos de los compuestos que se pueden separar por este método son: propanal, acetona, pentano, heptanal, etc.

4. Refractometría.

Ayra ⁶ observa un incremento en el índice de refracción que coincide con los olores a rancio. El reporta también cambios de este índice con los tres estados conocidos de la oxidación. En el periodo de la inducción donde la formación de peróxidos es baja, el índice de refracción permanece casi constante; durante la fase secundaria cuando los peróxidos aumentan, este índice también se incrementa, ésto se atribuye a la conjugación que precede a la formación de los hidroperóxidos. En el tercer periodo el índice de refracción sigue subiendo continuamente pero el incremento es más lento, posiblemente debido a la polimerización que tiene lugar ⁴⁴.

5. Método de los dienos conjugados.

La oxidación de ácidos grasos poliinsaturados está acompañada por un incremento en la absorción ultravioleta. Los ácidos grasos con insaturaciones conjugadas absorben de 230-375nm, un dieno a 243nm y un trieno a los 268nm ⁴⁴. Sin embargo los peróxidos o hidroperóxidos por sí solos no presentan absorciones notables en la zona de 210-400nm.

La mayoría de los métodos físicos descritos anteriormente han tomado importancia en la actualidad, debido a su precisión y sensibilidad y a que también se han logrado grandes avances en el área de los equipos de análisis; la desventaja se presenta porque casi todos requieren de equipos costosos que no están disponibles en todos los laboratorios.

I. 7. EXTRACCION DE LIPIDOS Y DE PRODUCTOS DE OXIDACION DE LIPIDOS.

A. Disolvente para extracción de lípidos.

La elección del disolvente de extracción es el paso más crítico en el análisis de lípidos totales, lípidos neutros, polares o ácidos grasos, e incluso los productos de oxidación.

Los métodos oficiales para extracción de grasa en carnes que utilizan éter de petróleo, éter etílico o hexano, dan baja recuperación en muestras con escaso contenido de grasa^{2,3} y que contienen lípidos polares, extraen sólo una porción de los fosfolípidos, comparando con mezclas de disolventes como diclorometano:metanol^{49, 113}.

Estos tres disolventes tienen ventajas y desventajas; tienen la desventaja de la volatilidad; ni el éter de petróleo ni el hexano extraen proteínas y almidón, y tampoco absorben agua, el éter etílico sí lo hace y además extrae algunos azúcares y otras sustancias no grasas; sin embargo es mejor disolvente para grasas si lo comparamos con el éter de petróleo y el hexano¹¹³.

Erickson M.C.³³ en un estudio de comparación de disolventes para extracción de lípidos de pez gato obtiene cantidades similares de fosfolípidos y triacilglicérols con las mezclas de: cloroformo:metanol:agua, hexano isopropanol y cloroformo:isopropanol pero hay mayor contaminación de proteínas en los últimos dos sistemas³².

El método de Folch *et al.*³⁸ así como el de Bligh y Dyer¹³ se utilizan para análisis de lípidos de tejidos¹¹³, este último está demostrado que extrae cantidades significativamente mayores de lípidos totales que el método oficial de Soxhlet; el método de la AOAC extrae el 90% de

los lípidos totales extraídos por otros métodos, extrae todos los triglicéridos y sólo un 25% de los lípidos polares ¹¹⁵, ésto en estudios hechos en carne de res con contenido intermedio de grasa. El éter de petróleo y el hexano son no polares mientras que el éter etílico es algo más polar; la grasa libre que se encuentra separada de la matriz es fácilmente extraída por ellos pero las muestras deben estar desecadas y trituradas en partículas muy finas para que haya una buena penetración del disolvente.

Estos tres disolventes tienen ventajas y desventajas; tienen la desventaja de la volatilidad, ni el éter de petróleo ni el hexano extraen proteínas y almidón, y tampoco absorben agua, el éter etílico si lo hace y además extrae algunos azúcares y otras sustancias no grasas; sin embargo el éter etílico es mejor disolvente para grasas ¹¹³.

Algunos estudios demuestran que las extracciones de lípidos de carne de res con mezclas de cloroformo:metanol son más efectivas que con los disolventes de los métodos oficiales ⁴⁹.
¹¹⁵

El cloroformo está considerado un potente carcinógeno ^{93, 106} por lo que se recomienda sustituirlo en los laboratorios con otros disolventes cuyo uso no implique mucho riesgo para la salud. El diclorometano ha sido recomendado por ser menos tóxico. Chen *et al.* ²⁵ reporta que el diclorometano puede sustituir al cloroformo en extracción de lípidos de alimentos, que es tan eficiente como éste en la extracción de lípidos totales, fosfolípidos, ácidos grasos, esteroides y triglicéridos ^{32, 115}.

La mezcla de diclorometano:metanol está siendo cada vez más utilizada para la extracción de lípidos de diferentes matrices, sobre todo alimentos ^{126, 140}, debido a que por ser una mezcla de disolventes con polaridades diferentes (el metanol es muy polar y el

diclorometano es de baja polaridad) va a extraer de las matrices alimenticias tanto los lípidos polares como los neutros. Lo que no ocurre con los disolventes oficiales pues el éter de petróleo y el hexano como se explica anteriormente son no polares, entonces en una matriz que tenga una proporción alta de lípidos polares se estará subestimando el porcentaje de los mismos; con el éter etílico este fenómeno será menor ya que es algo más polar. Por estos pocos ejemplos puede uno darse cuenta de que el disolvente que se utilice en la extracción de lípidos es determinante tanto para la cuantificación como para análisis posteriores de ese extracto lipídico.

Cabe recalcar que para elegir el disolvente hay que analizar muy bien las características de la matriz alimenticia pues estos dos factores son de suma importancia para obtener un estudio exitoso.

B. Procedimientos de extracción de lípidos.

El mejor criterio para evaluar la conveniencia de un método de extracción de lípidos es la calidad y la cantidad de lípidos recuperados, esto es importante porque se puede en ciertos casos causar degradación de los lípidos que se extraen³².

En muestras biológicas tales como carne o lácteos, algunos lípidos simples pueden ser extralidos por medios físicos, como por ejemplo el uso de microondas, pero los lípidos complejos pueden estar física y químicamente unidos a proteínas, polisacáridos y otros componentes celulares, formando enlaces iónicos, puentes de hidrógeno y mediante fuerzas de Van der Waals, por ello se requiere de procedimientos y sobre todo disolventes apropiados que rompan dichas interacciones y permitan la extracción de los lípidos; en este

punto cabe recalcar que las características químicas del disolvente son de suma importancia ya que dependiendo de ellas, el efecto sobre las interacciones entre los lípidos y las demás sustancias presentes en la muestra de interés, a su vez será distinto ¹¹³.

B. 1. Extracción continua por percolación o lavado continuo del material con el disolvente.

En estos procedimientos se mantiene el disolvente a ebullición conectado a un sistema de reflujó, de tal forma que el disolvente condensado gotea continuamente sobre el material que se desea extraer; el disolvente no debe acumularse en el recipiente en el que se encuentra la muestra, por ello ésta se coloca dentro de un material poroso. Un ejemplo de este procedimiento lo constituye el método de Goldfish. El principal inconveniente del método es que la muestra está en contacto con los vapores calientes del disolvente pudiendo producirse deterioro de los lípidos ⁶¹.

B. 2. Extracción Intermitente.

El sistema más conocido de este procedimiento es el utilizado en el método de Soxhlet ^{3, 115}, en éste se permite el paso de los vapores del disolvente hacia un condensador por medio de un tubo separado y el retorno del mismo condensado al recipiente en que es evaporado después de extraer los lípidos por medio del contacto con la muestra; en este sistema la muestra no está en contacto con los vapores calientes del disolvente; el sistema es poco eficiente ya que sólo el disolvente directamente en contacto con la muestra contiene lípidos debido a la poca circulación existente, se requiere gran volumen de disolvente.

En los procedimientos intermitentes los lípidos extraídos se mantienen en el recipiente que se calienta para evaporar el disolvente, por lo que pueden estar sujetos a deterioro.

Tanto en los métodos de extracción continua como intermitente es necesario que la muestra no contenga humedad pues eso disminuye la eficiencia de extracción de muchos disolventes.

B. 3. Digestión

Se puede realizar de dos maneras: en la primera, la muestra es mezclada con el disolvente, separándolos posteriormente, los lípidos se mantienen solubilizados. La principal desventaja es la necesidad de grandes volúmenes de disolvente. Como las condiciones de extracción son leves, la descomposición de los lípidos es mínima.

Al comienzo se pensó que si se adicionaba un disolvente miscible con el agua como el etanol al éter etílico, la mezcla penetraría más fácilmente en tejidos biológicos que contengan agua y este efecto haría que sea más eficiente la extracción de lípidos. Luego un gran número de procedimientos de extracción de lípidos totales de matrices biológicas han usado la mezcla de cloroformo:metanol para ello y estas técnicas se han extendido.

El procedimiento propuesto por Folch *et al.*³⁸ que usa la mezcla de cloroformo:metanol para la extracción de lípidos del cerebro y de tejidos animales es el más conocido. El método de Bligh y Dyer¹³ es bastante rápido para extraer lípidos de tejidos con una cantidad de agua significativa. Es muy utilizado cuando se va a determinar índice de peróxido en la grasa extraída, ya que en el método no se calienta la muestra o el extracto y no se modifica el Valor Peróxido por efecto de la temperatura.

Khor y Chan ⁶⁷ investigaron el uso de disolventes alternativos al cloroformo debido a su toxicidad; los lípidos fueron tratados con cloroformo:metanol, diclorometano:metanol y hexano:isopropanol, de acuerdo al método de Folch *et al.*³⁸ la mezcla de diclorometano:metanol demostró ser tan eficiente como la de cloroformo:metanol, sin embargo la mezcla de hexano:isopropanol dió valores más bajos en todos los lípidos.

El método que conlleva extracción de grasa calentando la muestra con una mezcla de cloroformo:metanol dá resultados equivalentes a los métodos que conllevan hidrólisis previa, con el fin de romper interacciones de los lípidos con otros componentes de la muestra.

Lento y Daugherty ⁷⁴ modificaron el procedimiento de Bligh y Dyer ¹³ y demostraron que es aplicable a una gran variedad de alimentos, incluyeron una digestión con enzimas antes de la homogenización con los disolventes.

Los lípidos de tejidos marinos pueden ser extraídos por gran variedad de procedimientos, uno de los más antiguos es el de Folch *et al.*³⁸ también está el de Bligh y Dyer ¹³ desarrollado para extracción de tejidos con bajo contenido en grasa, aunque es usado para otro tipo de tejidos ajustando el volumen de disolventes. Otro método utilizado es el de Hara y Radin ⁵³, el cual usa una mezcla de hexano:isopropanol (3:2).

Gunnlaugsdottir ⁴⁶ compara algunos métodos con diferentes disolventes de extracción de lípidos en tejido de pescado, reporta que la cantidad de lípidos extraídos por el método de Smith *et al.* ¹²¹ que usa cloroformo:metanol:agua en una extracción bifásica, es menor a la extraída por el método de Hara y Radin ⁵³ usando hexano:isopropanol y por el método de Bligh y Dyer ¹³ que utiliza cloroformo:metanol:agua en extracción monofásica; además reporta que el método de Hara y Radin es menos eficiente para extracción de lípidos polares

tanto en sistemas oxidados como no oxidados, debido a que el isopropanol es menos polar que el metanol. Por lo tanto este autor concluye que el hexano:isopropanol no es una mezcla alternativa al cloroformo:metanol para tejidos de pescado.

La segunda variación de este método es la digestión de la muestra generalmente con ácidos fuertes que rompen las interacciones de los lípidos con el resto de componentes de la muestra (principalmente proteínas y carbohidratos) en presencia de alcohol y agua, para liberar los lípidos, los cuales se separan por extracción con disolventes o por centrifugación, en donde se separan debido a su baja densidad se separan y pueden ser cuantificados en recipientes especiales. Es muy utilizado el método de Majonier y Babcock, también conocido como Gerber.

B. 4. Métodos físicos de extracción de lípidos

Actualmente se utilizan aparatos que extraen los lípidos por medio de la energía de las microondas que calientan la muestra a altas temperaturas, produciendo la evaporación del agua presente, de tal forma que se puede determinar el contenido de humedad y el de grasa.

El método de extracción de lípidos debe ser seleccionado de acuerdo al objetivo que tenga el estudio; se debe tener en cuenta qué parámetros se van a analizar, las características de la matriz en estudio sobre todo la composición de lípidos, la cantidad de muestra de que se dispone, el tiempo de duración del análisis, etc.

En este proyecto a más de la cuantificación de los lípidos se buscaba determinar los índices de deterioro oxidativo, esta es la principal razón por la que se seleccionó un método de

extracción en frío (Bligh y Dyer ¹³) que no causa deterioro adicional por efecto de la temperatura . Además de que se tiene la ventaja de que es muy rápido y está recomendado su uso en la bibliografía para matrices como carne y pescado.

II. TRABAJO EXPERIMENTAL.

El propósito de este trabajo fue establecer métodos válidos para el análisis de deterioro oxidativo en carne de res y pescado considerando el efecto de los disolventes de extracción de lípidos, y obtener parámetros de calidad por medio del monitoreo en almacenamiento de esas muestras.

El trabajo se realizó en 2 etapas, en la primera se seleccionaron y validaron los procedimientos de extracción y cuantificación de lípidos totales, así como los métodos para evaluar el deterioro oxidativo; en la segunda etapa estos métodos fueron aplicados a muestras de carne de res (sirloin) y sardina almacenados en congelación durante aproximadamente 12 meses para observar su evolución.

Las muestra de sardina se adquirió en la central de abastos de la Ciudad de México y la carne de res (molida y sirloin) en una distribuidora de carne. Fueron escogidas de manera aleatoria.

II. 1. 1ª ETAPA: VALIDACION DE METODOS

Algunas determinaciones se realizaron de inicio en muestras de carne molida comercial y posteriormente las mismas se practicaron en las muestras de sardina y carne de res (sirloin).

Se seleccionaron esas muestras ya que son ampliamente comercializadas en congelación, son ricas en grasa lo cual facilita el estudio y tienen diferente composición de lípidos (el pescado tiene lípidos más insaturados que la res).

A. Métodos de extracción y cuantificación del material lipídico.

1. Método de Bligh y Dyer¹³.

Se pesan de 2 a 20g de una muestra preparada (correctamente homogenizada) y previamente determinada el contenido de humedad en un vaso mezclador. Adicionar agua destilada suficiente para llevar el agua total presente a 16ml, junto con 40ml de metanol (marca Merck, grado analítico) y 20ml de diclorometano (Merck, grado analítico). Se macera durante 2min; Se agregan otros 20ml de diclorometano y se homogeniza por 10s en un homogenizador de laboratorio de marca Waring Commercial, a alta velocidad ; se agregan 20ml de agua y se macera nuevamente por 30s. Se centrifuga la mezcla en una centrifuga marca Damon modelo HT, por 10min de 2000 a 2500rpm. Se extrae la capa de diclorometano sin perturbar las demás y se filtra a través de papel filtro grueso (Watman # 2). La modificación hecha a este método consistió en cambiar el cloroformo por diclorometano en el caso de la carne de res y realizar la homogenización de la muestra con los disolventes.

Para la muestra de sardina se sustituyó el total de diclorometano y metanol por 60ml de éter etílico (Merck grado analítico), extrayéndose la grasa en la capa de éter etílico.

2. Método de Goldfish²

Se pesa 2g de muestra seca, se colocan en un cartucho en aparato de Goldfish y se los somete a reflujo con el disolvente, mediante la aplicación de calor durante varias horas. La

extracción termina cuando en un pedazo de papel filtro una gota de disolvente no deje mancha.

Para la cuantificación se pone a peso constante el vaso de Goldfish en el cual está la grasa y por diferencia se calcula el porcentaje de grasa.

3. Selección de disolventes

Se probaron disolventes y mezclas de disolventes de diferentes polaridades: cloroformo:metanol (clorof.:met.), diclorometano:metanol (dicloromet.:met), hexano:isopropanol (hexan.:isoprop.), éter etílico y éter de petróleo, utilizando distintos métodos de extracción.

Tabla 5. Selección de disolventes para extracción de lípidos.

METODO	DISOLVENTES				
	clorof.:met.	dicloromet.:met	hexan.:isoprop.	éter etílico	éter de petróleo
Bligh y Dyer	*	*	*	*	
Goldfish				*	*

4. Cuantificación de lípidos

Se toman del filtrado claro obtenido de la extracción 25ml y se pasan a un vaso a peso constante; se evapora el disolvente a sequedad sobre baño de vapor y se completa el secado en una estufa al vacío (marca National Appliance modelo 5831) a 60°C, se determina el peso.

B. Métodos de análisis de deterioro de lípidos.

1. Índice de Peróxido.

Es una medida de los peróxidos contenidos en una grasa. Los peróxidos son los productos mayoritarios en las primeras etapas de la rancidez oxidativa.

a) Método de la AOAC ².

Se basa en la reacción del yoduro de potasio, en medio ácido, con el oxígeno de los peróxidos. El yodo liberado se titula con tiosulfato de sodio.

-Determinación:

Se pesa 5 ± 0.05 g de muestra en un matraz de 250ml. Se adicionan 30ml de solución de ácido acético-diclorometano* (3:2 V/V, los reactivos utilizados fueron de la marca Merck de grado analítico) y agite para disolver la muestra. Adicione 0.5ml de solución saturada de yoduro de potasio (marca Merck grado analítico), se deja reposar con movimiento ocasional 1min y se añaden 30ml de agua destilada. Se titula con tiosulfato de sodio al 0.1N (marca Merck grado analítico) con agitación vigorosa hasta que el color amarillo casi desaparezca. Se adicionan 0.5ml de solución de almidón soluble al 1% (marca Merck grado analítico y se continúa la titulación con agitación para remover el yodo del diclorometano, hasta que el color azul desaparezca.

Si se usa menos de 0.5ml de tiosulfato 0.1N repita la titulación con tiosulfato 0.01N.

Corra un blanco en cada determinación, debe ser menor o igual a 0.1ml de tiosulfato 0.1N.

* El método original lleva cloroformo, pero debido a su toxicidad se sustituyó por diclorometano.

Para los cálculos se utiliza la siguiente fórmula:

$$\text{Valor Peróxido (meq/kg muestra) = } S \times N \times 1000 / \text{ g muestra}$$

S = ml de tiosulfato de sodio

N = normalidad del tiosulfato de sodio

b) Método Colorimétrico ³⁰.

El método se basa en la capacidad de los peróxidos de oxidar los iones ferrosos (Fe II) a férricos (Fe III). Su cuantificación se realiza por la producción de color rojo por la formación de un complejo entre el tiocianato y el Fe III.

El método es muy sensible.

- Determinación:

Se pesa exactamente de 1mg a 0,3g de muestra de grasa (W) en un tubo de ensayo. Se añade diclorometano*:metanol 70:30 (v/v, marca Merck grado analítico) hasta un volumen de 9.9ml y se mezcla para disolver la muestra. Se adicionan 0.05ml de solución de tiocianato de amonio (30% m/v, el reactivo fue marca Merck grado analítico), se mezcla y se mide absorbancia a 500nm (E_0) contra un blanco de la mezcla de diclorometano:metanol 70:30. Se adicionan 0.05ml de solución de cloruro ferroso (0.35% m/v que contiene 2% de HCl 10N, reactivos marca Merck grado analítico). Se mezcla y después de exactamente 5 min se

mide absorbancia de nuevo a 500nm (E2), simultáneamente se efectúa una determinación en un blanco de reactivos (E1).

Para preparar una curva de calibración de absorbancia contra concentración de hierro en μg usando una solución patrón de cloruro férrico que contiene 20ppm de Fe, se pesan 0.484g de cloruro férrico con 6 moléculas de agua en un matraz aforado se lleva a 100ml con una mezcla de diclorometano:metanol 70:30, de allí se toman 2ml y se afora a 100ml con la mezcla de diclorometano:metanol 70:30. Se utilizará de 0.25-2ml de patrón y de 9.65-7.9ml de la mezcla de diclorometano:metanol 70:30, lo cual da como resultado una concentración de 5-40 μg de Fe. Se adicionan 0.05ml de tiocianato de amonio y 0.05ml de ácido clorhídrico 0.2N y se mide absorbancia a 500nm frente a un blanco de reactivos.

* El método original utiliza cloroformo, pero dada su toxicidad se sustituyó con diclorometano.

Para los cálculos se utiliza la siguiente fórmula:

Si m es el número de μg de Fe y éste viene dado por: $E_2 - (E_0 + E_1)$

$$\text{Índice de Peróxidos} = m / 55.84 \times W = \text{mEq} / \text{kg}.$$

Al método original se le realizaron algunas modificaciones: se redujo el tamaño de la muestra de 0.3g a un rango de 1mg - 0.3g y se sustituyó el cloroformo por diclorometano debido a la toxicidad del mismo, con respecto a este último punto se realizó el análisis estadístico del método no encontrándose ninguna variación significativa.

2. Índice de TBA ⁴³.

El método mide el color rojo debido a la reacción entre dos moléculas de ácido tiobarbitúrico (TBA) y una de malonaldehído (MA) producto de la oxidación de lípidos ⁴².

- Determinación:

10g de muestra cruda se mezclan con 15ml de ácido perclórico frío al 9% (marca Merck grado analítico) y 10ml de agua destilada fría, en un homogenizador (marca Waring Commercial) de alta velocidad por 10s. La mezcla se lleva a 50ml con agua destilada y se filtra en papel W#2. 5ml del filtrado y 5ml de TBA 0.02M (reactivo Merck grado analítico) se mezclan en un tubo con tapón, se incuba por 17h a temperatura ambiente en la obscuridad ó en un baño de agua hirviendo por 30min. Se mide la absorbancia a 530nm contra un blanco de reactivos.

Se prepara una curva de calibración para calcular concentración utilizando la solución patrón de 1,1,3,3 -Tetraetoxipropano 1×10^{-3} M (marca Sigma grado analítico), de la que se toma de 10 μ L-80 μ L y se lleva a 5ml con agua lo cual dá una concentración de 1×10^{-8} - 8×10^{-8} M. Se adicionan 5ml de TBA 0.02M y se procede como con las muestras.

Para el cálculo de índice de TBA:

$$\begin{aligned} \text{Índice de TBA} &= \text{Moles TEP} \times 2 \times 1000 \times 1000 \times 72 \times \text{dilución} / \text{g muestra} \\ &= \text{mg Malonaldehído} / \text{Kg muestra.} \end{aligned}$$

3. Índice de Kreis ⁵⁴.

- Determinación:

En 5ml de diclorometano se disuelven de 0.05 - 5ml de grasa, se añaden 10ml de la solución de ácido tricloroacético al 30% en ácido acético glacial y se adiciona 1ml de floroglucinol al 1% (reactivos marca Merck grado analítico). Se agita e incuba por 15min en baño de vapor a 45°C. Se deja enfriar y se colocan 4ml de etanol (Merck grado analítico). Se corre simultáneamente un blanco de reactivos. Medir absorbancia a 545nm. Para la obtención del índice de Kreis se utiliza la siguiente fórmula:

$$IK = A_m - A_b / l \times c$$

Donde:

A_m = absorbancia de la muestra

A_b = absorbancia del blanco

l = longitud de la celda

c = concentración del aceite en g/ml de la solución final.

El método fue modificado: se redujo el tamaño de la muestra a un rango de 0.05 - 5ml y para el cálculo del Índice se utilizó la fórmula del método de Walters y col.²⁹ pero en lugar de usar Unidades Rojas se cambió por Absorbancia a 545nm. Además para disolver la muestra, se sustituyó el cloroformo por diclorometano.

II. 2. 2ª ETAPA: MONITOREO DEL DETERIORO OXIDATIVO DE LÍPIDOS EN CARNE DE RES (SIRLOIN) Y PESCADO (SARDINA) CONGELADOS.

A. Preparación de las muestras.

a) Carne de res: Para el monitoreo en almacenamiento se utilizó un corte de carne de res, (sirloin), luego de homogenizar las muestras fueron almacenadas en bolsas de polietileno de color negro a -18°C durante aproximadamente 390 días. El monitoreo se efectuó desde el tiempo cero en intervalos variables.

b) Pescado: la especie elegida fue sardina. Se almacenó en porciones de aproximadamente 500g en bolsas de polietileno de color negro a -18°C ; posteriormente para cada monitoreo se homegenizó la sardina integra.

Debido a que al inicio del estudio de las muestras en almacenamiento no era temporada de sardina mexicana se comenzó el mismo con un lote de sardina portuguesa que llevaba aproximadamente 14 meses en congelación comercial entre -18 a -20°C , esta sardina llevaba como fecha de caducidad 24 meses.

Las muestras de sardina mexicana se almacenaron aproximadamente 1 año.

B. Extracción directa de lípidos con disolventes¹³.

El método utilizado fue el de Bligh y Dyer, descrito en la primera etapa.

C. Cuantificación de lípidos totales³⁰.

El método utilizado está descrito en la 1ª etapa de este trabajo.

D. Cuantificación de los índices de oxidación de lípidos de las muestras en almacenamiento.

Con el fin de determinar los índices de oxidación de lípidos se utilizaron los siguientes métodos: Índice de TBA, Índice de Peróxido e Índice de Kreis; los mismos fueron ya descritos en la 1ª etapa de este trabajo, en donde se describe también por que fueron seleccionados.

II. 3. ANALISIS ESTADISTICO

El análisis estadístico se aplica a un experimento con el objetivo de que los resultados de éste sean afectados lo menos posible por fuentes externas de variabilidad.

A. Cuadrado latino y cuadrado latino en bloque.

Son diseños factoriales en los que es posible eliminar más de una fuente de variabilidad y en el que al menos tres factores pueden ser variados durante el experimento; además suponen que no existe interacción apreciable entre los factores considerados, es decir son modelos *aditivos*¹⁷.

Pueden utilizarse también cuando los dos tipos de variables de bloques son de naturaleza diferente¹⁷.

El paquete utilizado en el análisis estadístico fue SPSS para PC (Statistical Package for Social Science).

III. RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados de todos los análisis realizados se encuentran en el apéndice.

En la primera etapa se realizó un estudio sobre los métodos de extracción de lípidos, el efecto de los diferentes disolventes en la cuantificación de los lípidos y los métodos de determinación de rancidez oxidativa.

Para la extracción de lípidos se probaron: el método de Goldfish ² y el de Bligh y Dyer ¹².

El método de Goldfish que es el oficial (AOAC) ² utiliza la muestra seca, la extracción se lleva a cabo por reflujo de ésta con disolvente; mientras que en el método de Bligh y Dyer se puede usar muestra húmeda y la extracción es en frío. Utilizando carne molida comercial, y posteriormente muestras de sirloin y sardina, se determinó que el segundo método es adecuado para este tipo de muestras, debido a que se logró buen rendimiento y precisión.

En la primera etapa también se experimentó con disolventes y mezclas de disolventes, de diferente polaridad, como: éter etílico, éter de petróleo, mezclas hexano:isopropanol, diclorometano:metanol y cloroformo:metanol.

Se estudió para muestras de carne molida comercial, cortes de sirloin y sardina mexicana congelados, el rendimiento en la cuantificación de lípidos y la influencia en los índices de oxidación, se encontró que el disolvente apropiado para carne de res, en cualquiera de las presentaciones es la mezcla de diclorometano:metanol, en tanto que el mayor rendimiento para la sardina, se presentó con éter etílico.

En la segunda etapa, ya con el método de extracción y el disolvente elegidos para cada una de las muestras, se procedió a la determinación de los índices de rancidez, realizando un monitoreo de la oxidación de lípidos, tanto de sirloin de res como de sardina, almacenados a -18°C . Las muestras de sirloin y sardina fueron elegidas por que generalmente tienen alto contenido de lípidos (hay que tomar en cuenta los factores que influyen en la composición de los animales, como son, edad, sexo, alimentación, etc.) y se comercializan en grandes cantidades en congelación¹².

III. I. 1ª ETAPA. VALIDACION DE LOS METODOS Y SELECCION DE LOS DISOLVENTES.

A. Trabajo Preliminar.

Se estudiaron métodos de extracción y disolventes de extracción, para lípidos. La muestra utilizada fue carne de res molida comercial. Se realizaron tres repeticiones de cada prueba, cada una por duplicado. En la tabla 6. se presentan los resultados.

Tabla 6. Extracción de lípidos de carne molida comercial.

<i>DISOLVENTE</i>	<i>METODO</i>	<i>% GRASA \pm SD</i>	<i>OBSERVACIONES</i>
cloroformo:metanol (1:1)	Bligh y Dyer	5.9 ± 0.05	macerado
		18.2 ± 0.65	homogenizado
dicloromet.:met. (1:1)	Bligh y Dyer	19.14 ± 0.28	homogenizado
hexano:isopropanol (3:2)	Bligh y Dyer	17.68 ± 0.10	Excesiva evaporación del hexano
éter etílico	Goldfish	15.29 ± 0.18	
éter etílico	Bligh y Dyer	16.8 ± 0.08	
éter de petróleo	Goldfish	14.33 ± 0.09	

De este trabajo preliminar se obtiene lo siguiente:

- El método de Bligh y Dyer presentó mayor rendimiento en la cuantificación de lípidos totales al incluirse en la técnica un proceso de homogenizado en lugar de la maceración, con la homogenización se obtuvo 5.9% de lípidos totales mientras que al licuar se cuantificó 18.2%.
- Entre el método de Goldfish, que es el oficial para extracción de material lipídico, y el de Bligh y Dyer, el que mayor cantidad de lípidos extrajo fue el segundo. El método de Bligh y Dyer tratándose de cuantificación de lípidos de carne de res molida comercial presentó diferencia altamente significativa con respecto a Goldfish en todos los casos excepto con éter etílico. El método de Goldfish dió menores rendimientos para esta misma muestra. El método de Bligh y Dyer ofrece ciertas ventajas como son: menor tiempo de extracción y sobre todo, el proceso se realiza sin necesidad de calor, lo que permitirá obtener resultados probablemente más reales, ya que los índices de oxidación no se verán afectados por la temperatura.
- La sustitución del cloroformo por diclorometano prácticamente no causó diferencias en la cuantificación de lípidos totales por el método de Bligh y Dyer. Con cloroformo:metanol se obtiene $18.2\% \pm 0.65$ de lípidos y con diclorometano:metanol $19.14\% \pm 0.28$.
- Se observa que las mezclas de disolventes dan mayor rendimiento, que los disolventes solos. En cuanto a la mezcla de hexano:isopropanol a pesar de que dá un buen rendimiento, se obtuvo 17.68% de lípidos, presentó mucha dificultad al manejar el disolvente, ya que se producía la rápida evaporación del hexano haciendo casi imposible la recuperación de los lípidos.

De estos resultados, se decidió utilizar el método de Bligh y Dyer para la extracción de los lípidos y como disolventes la mezcla de diclorometano:metanol (1:1) y el éter etílico; se utilizaron esos disolventes para tener sistemas de diferente polaridad y mejor rendimiento.

B. Determinación del efecto del disolvente de extracción en la cuantificación y en los índices de oxidación de lípidos.

Para la determinación del efecto de los disolventes en la cuantificación de lípidos, se probaron los dos disolventes de extracción seleccionados: éter etílico y la mezcla de diclorometano:metanol, utilizando el método de extracción de Bligh y Dyer, en ambos casos.

Posteriormente se procedió al estudio de la influencia de estos disolventes en los índices de oxidación. Todos los análisis se realizaron utilizando muestras preparadas de carne molida comercial de res, de sirloin y de sardina mexicana.

Podemos observar en la tabla 7. el resumen de los resultados para carne molida comercial de res, en las tablas 8 y 9 un resumen de los resultados para carne de res (sirloin) y en la tabla 10. para sardina mexicana. En la tabla 11, se presenta un resumen del análisis estadístico de estos resultados. Todos los datos encuentran en el apéndice de este trabajo.

Tabla 7. Efecto del disolvente de extracción en la cuantificación y en los índices de oxidación de lípidos en carne de res molida comercial.

<i>LIPIDOS TOTALES (%)</i>		
	<i>DICLOROMET.:MET.</i>	<i>ETER ETILICO</i>
X	7.70	6.87
SD	0.1	0.06
<i>INDICE DE PEROXIDO (meq/Kg muestra)</i>		
METODO DE LA AOAC		
X	0.24	0.105
SD	0.01	0.005
METODO COLORIMETRICO		
X	0.87	0.32
SD	0.04	0.017
<i>INDICE DE KREIS (en gramo de muestra)</i>		
X	0.101	0.081
SD	0.002	0.002

La influencia del disolvente de extracción en la cuantificación y en los índices de oxidación de lípidos obtenida para la carne molida comercial fue corroborada para la muestra de sirloin

En las tablas 7. y 8. se observan los resultados:

Tabla 8. % Lípidos totales en carne de res (sirloin)

<i>MUESTRA</i>	<i>DICLOROMETANO:METANOL</i>	<i>ETER ETILICO</i>
1	16.69	14.19
2	15.55	14.95
3	15.83	14.32
4	17.05	14.94
X	16.28	14.6
SD	0.61	0.34

El resultado del análisis estadístico demostró diferencia altamente significativa en el efecto del disolvente.

Tabla 9. Índices de oxidación de lípidos en carne de res (sirloin).

PARAMETRO	DICLOROMET.:METANOL					
	I		II		III	
MUESTRA	dm:m*	e-e**	dm:m	e-e	dm:m	e-e
IP AOAC (meq/Kg muestra)	0.19	0.9	0.2	0.14	0.68	0.01
(meq/Kg grasa)	1.25	0.13	1.35	1	4	0.6
IP Color. (meq/Kg muestra)	0.46	0.33	0.49	0.54	1.2	0.57
(meq/Kg grasa)	2.97	2.21	3.24	2.52	7	3.59
IK en gramo de muestra	0.09	0.01	0.5	0.2	7	1.3
gramo de grasa						

I, II y III: diferentes muestras, en tres tiempos distintos.

*dm:m = diclorometano: metanol

**e-e= éter etílico

Tabla 10. Efecto del disolvente de extracción en la cuantificación y en los índices de oxidación de lípidos en sardina mexicana.

LIPIDOS TOTALES (%)		
	<i>DICLOROMET.:MET.</i>	<i>ETER ETILICO</i>
X	8.38	9.60
SD	0.053	0.092
INDICE DE PEROXIDO (meq/Kg muestra)		
METODO DE LA AOAC		
X	7.75	10.99
SD	0.50	0.39
METODO COLORIMETRICO		
X	23.49	29.00
SD	0.64	0.80
INDICE DE KREIS (IK en /gramo de muestra)		
X	10.50	16.50
SD	2.10	3.40

Tabla 11. Análisis del cuadrado latino y cuadrado latino en bloques de la influencia del disolvente de extracción en la cuantificación y en los índices de oxidación de lípidos.

MUESTRA: CARNE DE RES			
	<i>VARIABLES</i>	<i>F (0.05)</i>	<i>F (0.01)</i>
LIPIDOS TOTALES			
	DISOLVENTES	**	**
INDICE DE PEROXIDO			
	METODOS	**	**
	DISOLVENTES	**	**
INDICE DE KREIS			
	DISOLVENTES	**	**
MUESTRA: SARDINA			
LIPIDOS TOTALES			
	DISOLVENTES	**	**
INDICE DE PEROXIDO			
	METODOS	**	**
	DISOLVENTES	**	**
INDICE DE KREIS			
	DISOLVENTES	**	**

**** Diferencia altamente significativa**

Analizando el efecto de los disolventes en la cuantificación de lípidos y en los índices de oxidación de acuerdo a los resultados de las tablas 7, 8, 9 y 10, tenemos que:

- Para la carne molida comercial de res, la extracción con la mezcla de diclorometano:metanol dió mayores valores en los porcentajes de lípidos totales, presentándose en el análisis estadístico una diferencia altamente significativa entre la extracción con diclorometano:metanol y éter etílico.

La composición de los lípidos de la carne de res es probablemente la que determina estos resultados. La mezcla de disolventes es más polar que el éter etílico.

- Los lípidos de carne de res extraídos con la mezcla de diclorometano:metanol presentaron índices de oxidación más altos que los extraídos con éter etílico, siendo la diferencia también en este caso, altamente significativa.

- Por el contrario, la muestra de sardina presentó el mayor rendimiento para lípidos totales, con éter etílico y así mismo en los lípidos extraídos con este disolvente se observaron los mayores índices de oxidación. En ambos casos la diferencia fue altamente significativa al realizarse el análisis estadístico.

Esto se debe probablemente a que la grasa del pescado tienen una alta proporción de lípidos neutros y el disolvente de baja polaridad favorece la extracción de estos compuestos.

- Con respecto a los métodos utilizados para evaluación de índice de peróxido tenemos que en las dos muestras estudiadas, el método colorimétrico presenta valores superiores, probablemente por su alta sensibilidad.

- El análisis estadístico demostró que entre los métodos para determinar Índice de Peróxido, el método de la AOAC y el colorimétrico, hay diferencia significativa.

- Para las dos muestras estudiadas, tanto en cuantificación de lípidos como en determinación de índices de oxidación de lípidos, la diferencia entre los dos sistemas de disolventes, la mezcla de diclorometano:metanol y el éter etílico, es altamente significativa.

III. 1. 2ª ETAPA MONITOREO DE LA OXIDACION DE LIPIDOS EN LAS MUESTRAS DE CARNE DE RES Y PESCADO ALMACENADAS EN CONGELACION A -18°C.

De acuerdo con los resultados de la etapa anterior, el disolvente de extracción para el sirloin fue el diclorometano:metanol y para la sardina, el éter etílico, utilizando para ambos casos el procedimiento de Bligh y Dyer para la extracción de lípidos.

En los gráficos y tablas que se presentan a continuación se pueden observar los resultados para cada matriz alimentaria.

1. Monitoreo de oxidación de lípidos en carne de res (sirloin)

Tabla 12. Evolución de los índices de oxidación de los lípidos de carne de res, en almacenamiento a -18°C , extraídos con diclorometano:metanol.

PARAMETRO	Tiempo de almacenamiento (Días)						
	0	19	41	82	169	319	394
% Grasa	16.69	15.55	15.83	17.05	16.2	16.8	15.6
TBA (mg MA/Kg muestra)	0	0.88	1.01	2.31	1.7	4.8	3.97
IK (en grano de grasa)	0	0	0	0.58	3.09	41.6	28
IP AOAC (moq/Kg grasa)	0	1.25	1.35	4	10.2	13.9	5.2
IP Color. (moq/Kg grasa)	0.39	2.97	3.24	7.09	16	36.9	10.7

TBA: Índice de Ac. Tiobarbitúrico

IP AOAC: Índice de Peróxidos utilizando el método Oficial del AOAC

IP Color.: Índice de Peróxidos utilizando el método colorimétrico

IK: Índice de Krcis

OXIDACION DE LIPIDOS EN CARNE DE RES
Almacenamiento a -18 grados C.
Disolvente de extracción: diclorometano/metanol

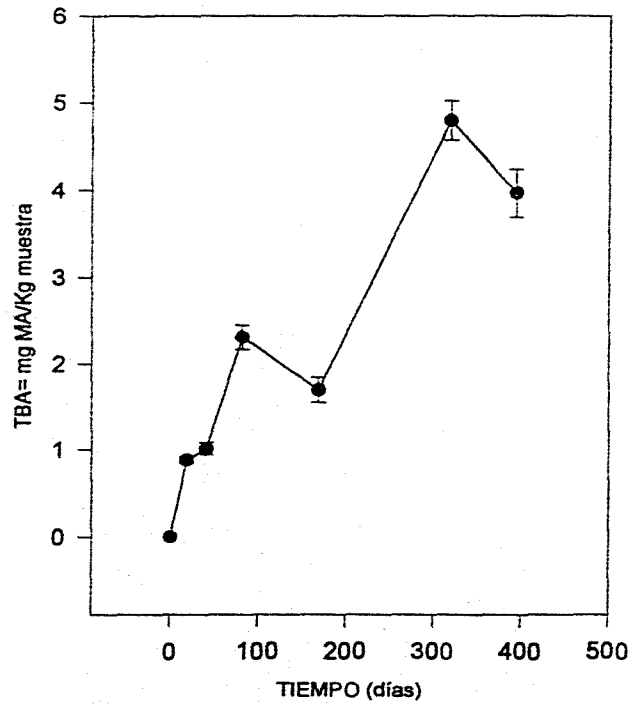


Gráfico 1

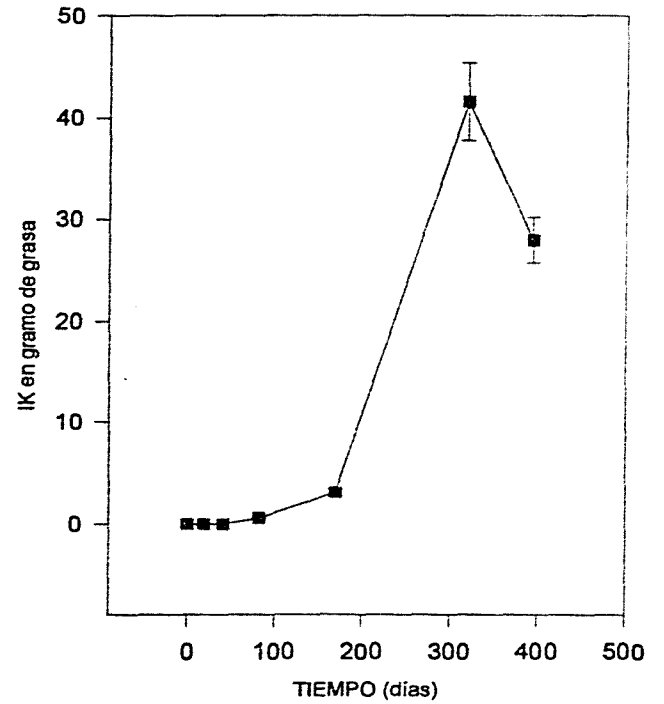


Gráfico 2

OXIDACION DE LIPIDOS EN CARNE DE RES
Almacenamiento a -18 grados Centígrados
Disolvente de extracción: diclorometano:metanol

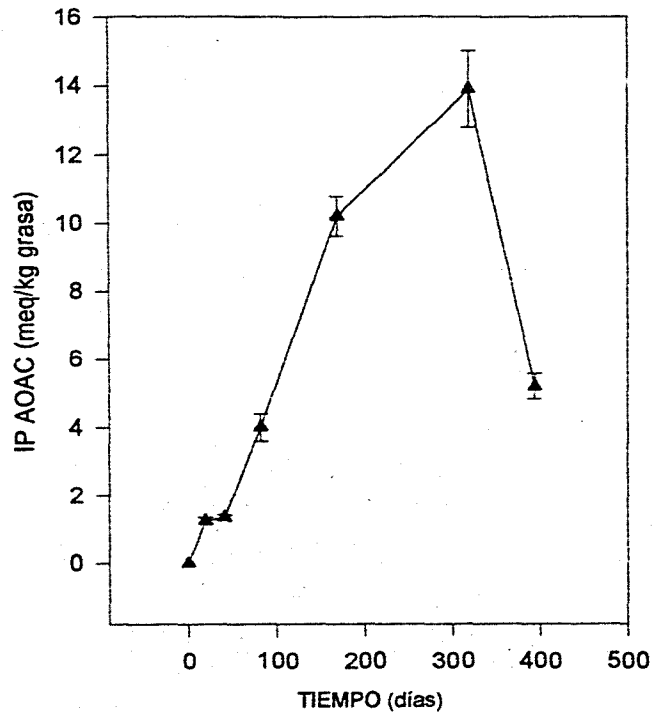


Gráfico 3

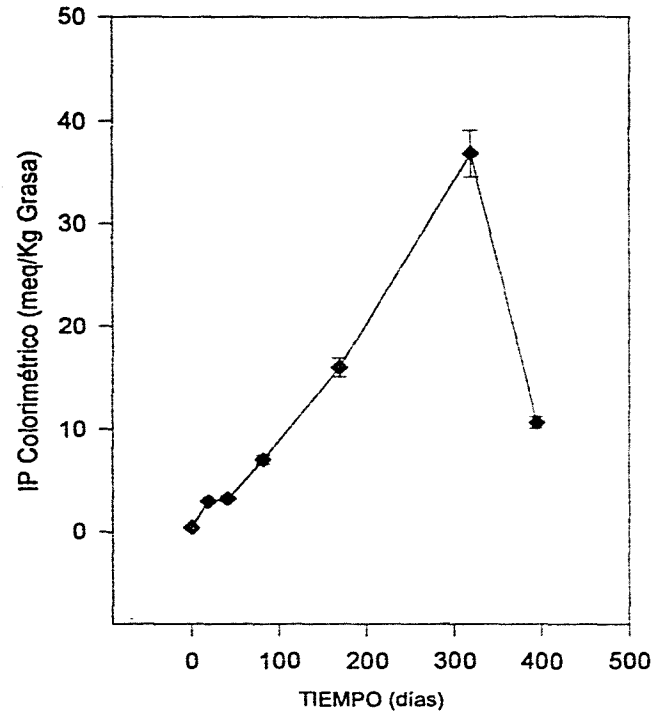


Gráfico 4

En este estudio de la evolución de los productos de oxidación de las muestras de carne de res (sirloin) en almacenamiento se observa lo siguiente:

- Los peróxidos, en ambos métodos utilizados (gráficos 3 y 4), llegan a un punto máximo a los 319 días y posteriormente disminuyen. Este comportamiento se justifica si se considera que cuando disminuyen la velocidad de descomposición es mayor a la de formación. Si se siguiese el monitoreo es posible que se observe su desaparición.
- Los aceites frescos tienen índices de peróxidos menores a 10meq/Kg de lípidos²⁴. Valores entre 20-40meq/Kg de grasa se presentan con aromas y sabores a rancio. Aunque para interpretar los resultados es necesario considerar el tipo de grasa debido a las enormes diferencias en la composición de éstas²⁹, para los lípidos de carne de res (sirloin) en el máximo de peróxidos se encuentra un valor de 36.9meq/Kg grasa, con lo que podría considerarse que la muestra ya se encuentra en el intervalo de rechazo.
- El índice de TBA (gráfico 1) permanece en un valor más o menos constante, después de que se observa que los peróxidos disminuyen. Este índice es una medida del malonaldehído, un producto secundario de degradación que se forma en la descomposición de los hidroperóxidos y que puede ser importante para el olor y sabor a rancio.
- El Índice de Kreis (gráfico 2) que es también una medida de productos secundarios de degradación de lípidos, permanece luego de que los peróxidos disminuyen, presentando un comportamiento semejante al del índice de TBA.

2. Monitoreo de la oxidación de lípidos en sardina mexicana.

Como se explicó anteriormente se analizaron dos lotes de sardinas de distinta procedencia, por ello el análisis de los resultados se hace por separado.

En la tabla 13. se encuentran los resultados del monitoreo de la sardina mexicana en almacenamiento.

Tabla 13. Evolución de los índices de oxidación de lípidos extraídos de sardina mexicana, almacenada a -18°C , extraídos con éter etílico.

PARAMETRO	Tiempo de Almacenamiento (Días)			
	0	103	253	328
% GRASA	5.92	6.03	5.1	4.74
TBA (mg MAAg muestra)	5.75	8.49	39.7	34.8
IK (en gramo de grasa)	31	33.5	490	426
IP AOAC (mcu/kg grasa)	16	18	96	41
IP Color. (mcu/kg grasa)	61.6	62.58	293	157

TBA: Índice de Ac. Tiobarbitúrico

IP AOAC: Índice de Peróxidos utilizando el método Oficial del AOAC

IP Color.: Índice de Peróxidos utilizando el método colorimétrico

IK: Índice de Kreis

OXIDACION DE LIPIDOS EN SARDINA MEXICANA
Almacenamiento a -18 grados Centígrados
Disolvente de extracción: éter etílico

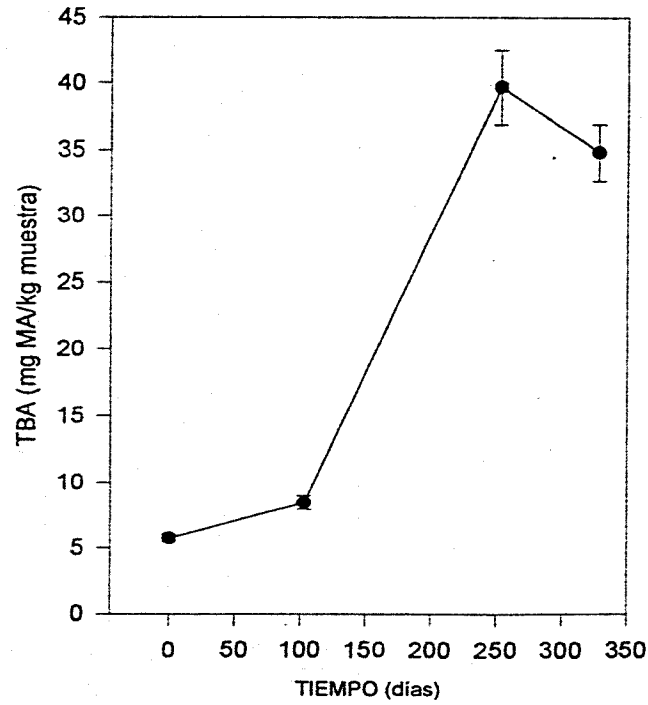


Gráfico 5

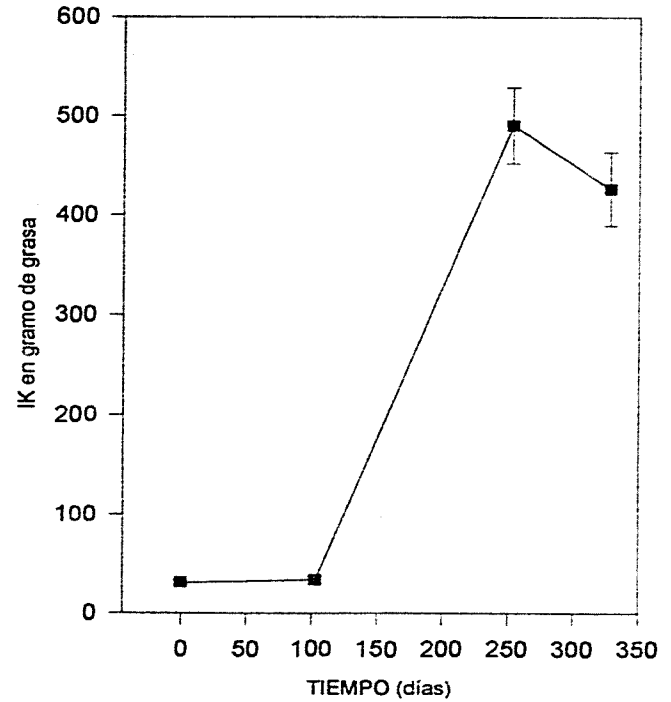


Gráfico 6

OXIDACION DE LIPIDOS EN SARDINA MEXICANA
Almacenamiento a -18 grados Centígrados
Disolvente de extracción: éter etílico

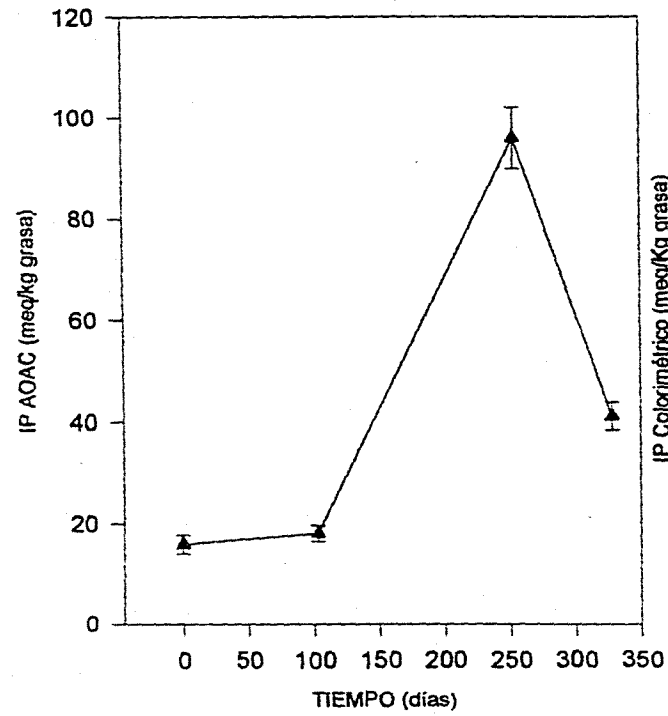


Gráfico 7

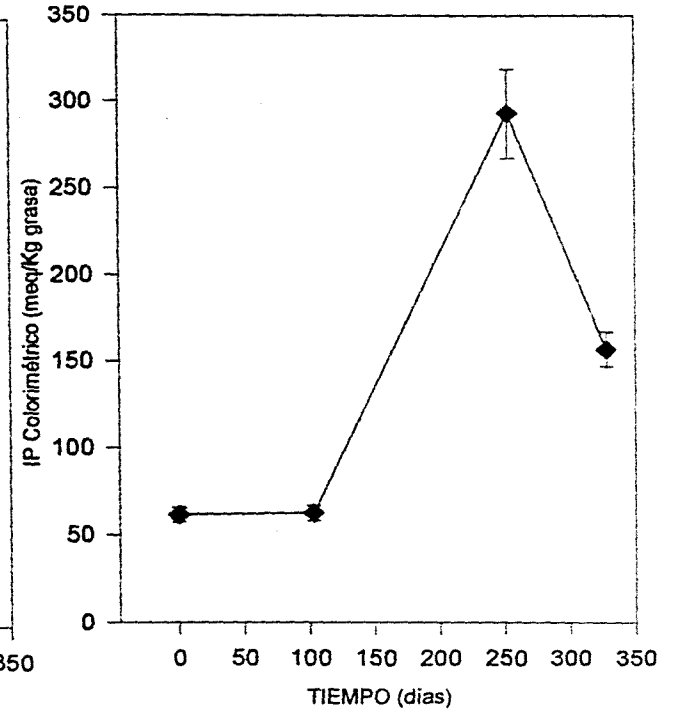


Gráfico 8

De los resultados de la tabla 13. y los gráficos 5, 6, 7 y 8, se puede determinar lo siguiente:

- El Índice de TBA (gráfico 5) llega a su máximo aproximadamente en el día 250, al igual que los demás indicadores de deterioro, alcanza un valor de 39.7mgMA/Kg muestra.
- Los índices de TBA y Kreis se mantienen más o menos constantes luego de producirse el valor máximo en la curva.
- El Índice de Peróxido (gráficos 7 y 8) tanto, por el método de la AOAC, como por el método Colorimétrico disminuyen aproximadamente a la mitad luego de transcurridos alrededor de 75 días después de su valor máximo, el cual se encuentra a los 254 días.
- El método Colorimétrico para determinación de Peróxidos muestra valores bastante mayores a los obtenidos por el método oficial de la AOAC.
- Los índices de deterioro se incrementan aproximadamente a partir de los 3 meses de almacenamiento.
- En el tiempo cero se presentan positivos todos los índices de oxidación estudiados, en especial el Índice de Peróxido (Método de la AOAC), el cual se encuentra sobre los límites de aceptación descritos para aceites puros, su valor alcanza 16meq/kg de grasa. Se podría pensar en que se traten de valores basales para esta especie, sin embargo en la bibliografía no se reportan.

3. Monitoreo de oxidación de lípidos en sardina portuguesa.

Como se indicó en materiales y métodos, la muestra de sardina portuguesa había permanecido almacenada por 14 meses en congelación comercial, de tal forma que el monitoreo inicia a los 422 días.

Tabla 14. Evolución de los índices de oxidación de lípidos extraídos de sardina portuguesa, almacenada a -18°C , extraídos con éter etílico.

PARAMETRO	Tiempo de almacenamiento (Días)					
	422	432	474	489	603	759
% GRASA	9.15	10.1	8.92	9.12	8.0	7.65
TBA (mg MA/Kg muestra.)	115	122.5	140.4	145.9	132.8	129.9
IK (en grano de grasa)	872	827	1173	1413	1625	1660
IP AOAC (meq/Kg grasa)	210	185	128	90	105	117
IP Color (meq/Kg grasa)	842	411	353	252	194	275

TBA: Índice de Ac. Tiobarbitúrico

IP AOAC: Índice de Peróxidos utilizando el método Oficial del AOAC

IP Color.: Índice de Peróxidos utilizando el método colorimétrico

IK: Índice de Kreis

OXIDACION DE LIPIDOS EN SARDINA PORTUGUESA
Almacenamiento a -18 grados Centígrados
Disolvente de extracción: éter etílico

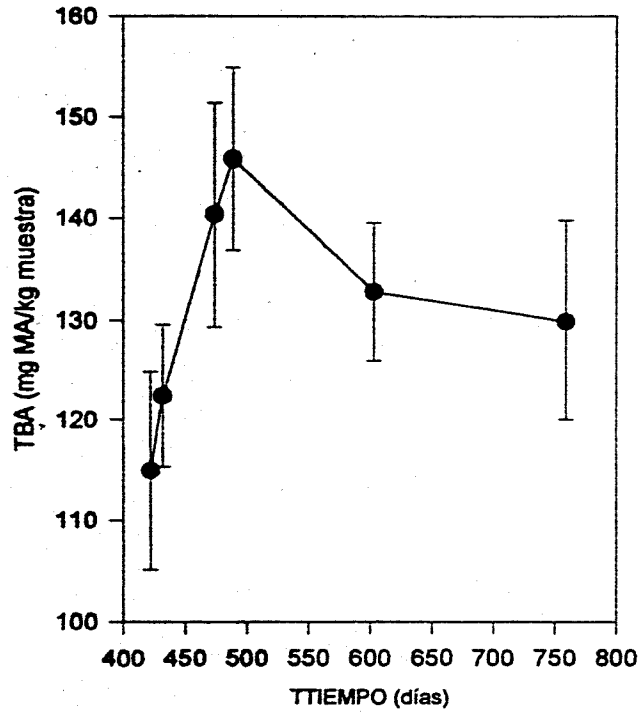


Gráfico 9

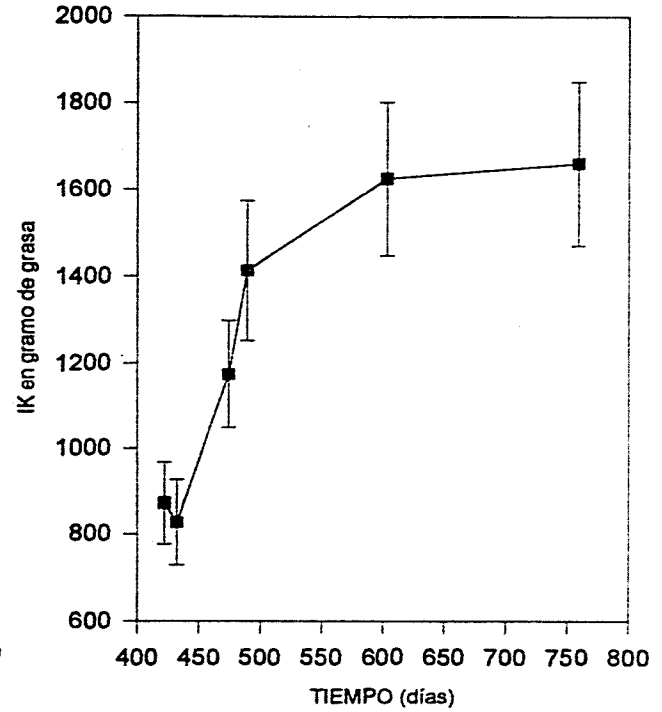


Gráfico 10

OXIDACION DE LIPIDOS EN SARDINA PORTUGUESA
Almacenamiento a -18 grados Centígrados
Disolvente de extracción: éter etílico

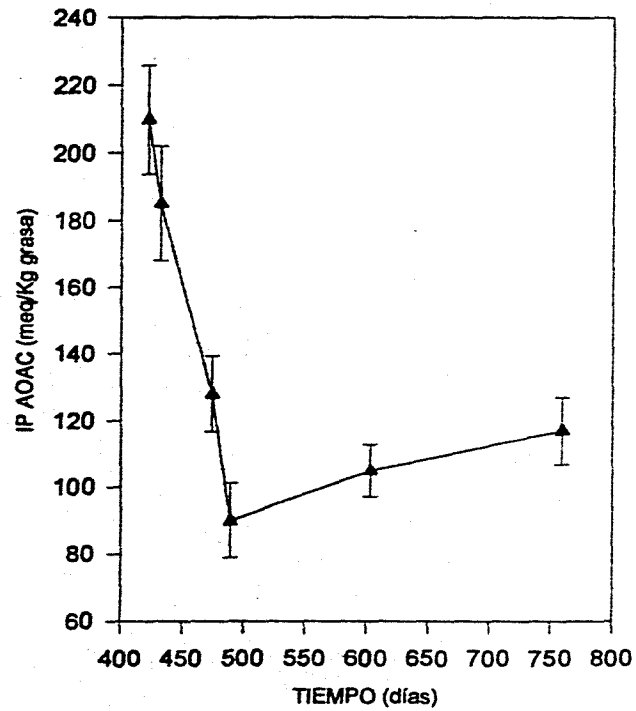


Gráfico 11

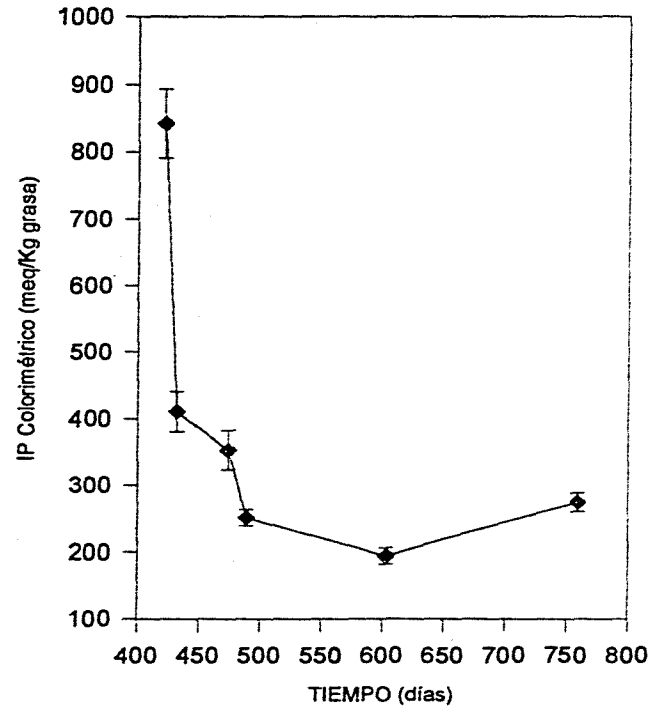


Gráfico 12

Analizando el monitoreo realizado en las muestras de sardina portuguesa (gráficos 9, 10, 11 y 12) almacenadas por más de 24 meses a -18°C , se observa lo siguiente:

- Para la sardina portuguesa no se pudieron monitorear los índices de oxidación en el tiempo cero, debido a que al inicio del estudio no era temporada de sardina y se tuvo que esperar varios meses para conseguirla fresca.
- Entre las muestras de sardina mexicana y portuguesa se nota, que la sardina portuguesa presenta tanto, para Índice de TBA (gráfico 9), como para Índice de Kreis (gráfico 10) valores máximos mayores a los de la mexicana, seguramente por la composición y el contenido de lípidos también diferentes. La sardina mexicana analizada en almacenamiento tiene aproximadamente 5.45% de grasa y la portuguesa alrededor de 9.6% de lípidos. En este punto hay que considerar que muchos factores pueden influir en la composición de un animal, la dieta, el sexo, el clima, etc.
- El índice de Kreis permanece luego de que los peróxidos disminuyen, al igual que el Índice de TBA. Ambos índices son indicadores de oxidación secundaria; en estos parámetros a diferencia del Índice de Peróxido, si se ve que el valor alcanzado alrededor del día 490, es el máximo.
- Los peróxidos (gráficos 11 y 12) a los 422 días, cuando se realiza el primer análisis en sardina portuguesa, tienen un valor alto, pero sin embargo no se puede precisar si es el máximo, a partir de allí disminuyen progresivamente, lo cual indica que se está llevando a cabo su descomposición acelerada.
- Según algunos autores el Índice de peróxido no siempre coincide con el desarrollo de aromas y sabores a rancio, pero se ha visto que esto varía con la composición de la grasa.

IV. CONCLUSIONES

- Para la carne de res, tanto la molida comercial como el sirloin, se obtiene mayor rendimiento en la extracción de lípidos totales utilizando una mezcla de disolventes, el diclorometano:metanol; debido muy probablemente a que la carne de res posee mayor proporción de lípidos polares en comparación con los del pescado que tiene alto contenido de lípidos neutros^{46, 69}.
- Los índices de oxidación en las muestras de carne de res son también mayores cuando la extracción se lleva a cabo con la mezcla de diclorometano:metanol.
- En cuanto a las muestras de sardina ocurre lo contrario, se observan mayores contenidos de lípidos totales y mayores índices de oxidación al realizar la extracción con un disolvente de menor polaridad como el éter etílico.
- Se recomienda utilizar en caso de carne de res, la mezcla de diclorometano:metanol y en pescado éter etílico, tanto para cuantificación como para determinación de índices de oxidación de lípidos.
- En relación a los puntos anteriores se concluye que el disolvente de extracción es de suma importancia cuando se trata de cuantificación y de determinación de índices de oxidación de lípidos mediante métodos que requieran los lípidos aislados de la matriz alimentaria. Y que cada alimento requiere un tratamiento especial de acuerdo a sus características.
- Con respecto al almacenamiento en congelación se observa que para carne de res (sirloin) el tiempo de almacenamiento en el cual el índice de peróxido permanecen por debajo de la norma para aceites puros (10meq/Kg de lípidos) es de aproximadamente 82 días, ya para los

169 días está fuera de esa especificación, alcanzando por el método colorimétrico 16meq/kg de grasa.

- La sardina mexicana desde el tiempo cero del almacenamiento presenta oxidación de lípidos, por lo que se recomendaría mejorar la manipulación luego de la pesca (ver cap.I en preservación de los alimentos) y no almacenarla por más de 100 días que es cuando el deterioro aumenta aceleradamente.

- Para sardina portuguesa se observa que el deterioro es muy alto a los 400 días aproximadamente, a pesar de que no se cuenta con el monitoreo a tiempo 0, a los 14 meses se tienen índices muy elevados de oxidación de lípidos, esto es importante ya que la fecha de expiración de este producto era de 24 meses

- La sardina portuguesa presenta índices de oxidación con valores más altos a los que presenta la sardina mexicana, hay que considerar que se trata de dos especies distintas de sardina que además tienen un habitat diferente, la sardina portuguesa está sujeta a temperaturas más bajas, lo que probablemente hace que posea mayor cantidad de ácidos grasos insaturados para mantener la fluidez de los lípidos¹⁶. Otro factor que puede influir es la dieta.

- Los índices de oxidación encontrados para la carne de res, alcanzan valores menores a los observados para las muestras de sardina. Por otro lado, el tiempo en el que se llega a un máximo en los valores índices de oxidación, es mayor, debido probablemente a que la composición de los lípidos de estas muestras es diferente, los lípidos de pescado tienen un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados que los hace más susceptibles a oxidarse.

- Los métodos utilizados en este estudio para cuantificación y determinación de índices de oxidación en lípidos resultaron adecuados, presentaron reproducibilidad y repetitividad.
- Finalmente se concluye también que deben utilizarse por lo menos dos métodos para la determinación del deterioro por oxidación de lípidos, de tal manera que se cubran la mayor parte de las fases del proceso.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Akamittath J.G., Brekke C.J. y Schanus E.G. 1990. "Lipid oxidation and color stability in restructured meat systems during frozen storage". J. Food Sci. **55**:6 1513-1517.
- (2) AOAC, 1990. "Official Methods of Analysis, 15th. Ed." Association of Official Analytical Chemists, Inc. Arlington, VA. USA.
- (3) AOAC. 1995. International. Official Methods of Analysis. 16th. De. AOAC Internacional. U.S.A.
- (4) Ajuyah A.O., Fenton R.T. y Sim J.S.1993. "Measuring lipid oxidation volatiles in meats". J. Food Sci. **58**:2 270-277.
- (5) Akiba M., Motohiro T. and Tankiawa E. 1967. "Preventing denaturation of the proteins in frozen fish muscle and fillets. I. Effect on additives on the quality to frozen minces fish muscle". J. Food Technol. **2**: 69.
- (6) Ayra S.S., Ramaujam S. y Vijayaraghavan P.K. 1969." Refractive index as an objective method for evaluation of rancidity in edible oils and fats" J.AOCS. **46**:28.
- (7) Badings H.T. 1960. "Principles of autoxidation processes in lipids with special regard to the development of autoxidation off-flavors". Neth Milk Dairy J. **14**:215-242.
- (8) Barthel G. y Grosh W. 1974. "Peroxide Value Determination-Comparison of Some Methods". J.AOCS. **51**:540-544.
- (9) Bauer E.L. 1970. Manual de Estadística para Químicos. Ed. Alambra. España.
- (10) Belitz H-D. y W. Grosch. 1986. Food Chemistry. USA.
- (11) Berry B.W. 1994. "Fat level, high temperature cooking and degree of doneness affect sensory, chemical and physical properties of beef patties". J. Food Sci. **59**:1 10-14.
- (12) Bird R.P., Hung S.O. Silas, Hadley M. and Draper H.H. 1983. "Determination of Malonaldehyde in Biological Materials by High-Pressure Liquid Chromatography". Anal. Biochem. **128**:240-244.
- (13) Bligh E.G. and Dyer W. J. 1959. "A rapid method of total lipid extraction and purification" Can. J. Biochem. and Physiology. **17**: 3 911-917.
- (14) Boggess T.S., Heaton E.K. and Shewfelt A.L. 1971. "Storage stability of commercially prepared and frozen pond-raised channel catfish (*Ictalurus punctatus*)". J. Food Sci. **36**:969-973.

- (15) Bone David. 1973. "Water Activity in Intermediate Moisture Foods". Food Technol. Abril 73-76.
- (16) Borgstrom Georg. 1961. Fish and Food. vol.1. De. Academic Press. New York. USA.
- (17) Box George E. P., Hunter William G. y Hunter J. Stuart. 1988. Estadística para Investigadores. Introducción al Diseño de Experimentos, Análisis de Datos y Construcción de Modelos. Ed. en Lengua Inglesa John Wiley and Sons, Impreso por E.d. Reverté. España.
- (18) Brewer M. Susan, Ikins William G. y Harbers Carole A.Z. 1992. "TBA values, sensory characteristics, and volatiles in ground pork during long-term frozen storage: effects of packaging". J. Food Sci. 57:3 558-585.
- (19) Brewer M.S. y Wu S.Y. 1994. "Display, packagine and meat block location effects on color and lipid oxidation of frozen lean ground beef". J. of Food Sci. 58:6 1219-1223.
- (20) Brown Phyllis R. y Krstulovic Ante M. 1979. "Practical aspects of reversed-phase liquid chromatography applied to biochemical and biomedical research". Anal. Biochem. 99 1-21.
- (21) Bruunjensen L., Skougaard M., Skibsted L.H. y Bertelsen G. 1994. "Antioxidant synergism between tocopherols and ascorbylpalmitate in cooked minced turkey". Zeitschrift für lebensmittel-Untersuchung und- Forschung. 199:3 210-213.
- (22) Bullock K.B., Huffman D.L., Egbert W.R., Mikel W.R., Bradford D.D. y Jones W.R. 1994. "Storage Stability of Low-fat Ground Beef Made with Lower Value Cuts of Beef". J. Food Sci. 59:1 6-9.
- (23) Careche M. y Tejada M. 1990. "The effect of neutral lipids and oxidized lipids on functionality in hake (*Merluccius merluccius* L): a dimethylamine- and formaldehyde-forming species during frozen storage". Food Chem. 36:2 113-128.
- (24) Charley Helen. 1982. Food Science. Macmillan Publishing Co. USA.
- (25) Chen I.S., Shen C.S. and Sheppard A.J. 1981. "Comparison of methylene chloride and chloroform for the extraction of fats from food products". J. Am. Chem. Soc. 58: 599-601.
- (26) Cross J.W., Berry B.W. y Wells L.H. 1980. "Effects of fat level and source on the chemical, sensory and cooking properties of ground beef patties". J. Food Sci. 45:791-793.
- (27) Day E.A. 1960. "Autoxidation of milk lipids". J.Dairy Sci. 43: 1360-1365.
- (28) Decker E.A. y Hultin H.O. 1990. "Factors influencing catalysis of lipid oxidation by the soluble fraction of mackerel muscle". J. Food Sci. 55:4 947-950.

- (29) Du Zhanyuan y Bramlage William J. 1992. "Modified thiobarbituric acid assay for measuring lipid oxidation in sugar-rich plant tissue extracts". *J. Agric. Food Chem.* **40:9** 1566-1570.
- (30) Egan Harol, Kirk Ronald S. y Sawyer Ronal. 1988. *Análisis Químico de los Alimentos de Pearson*. Ed. Continental. México.
- (31) Egbert W.R., Huffman D.L., Chen C.C. y Dylewski D.P. 1991. "Development of low-fat ground beef". *Food Technol.* **45:64-73**.
- (32) Erickson M.C. 1993. "Lipid extraction from channel catfish muscle: comparison of solvent systems". *J. Food Sci.* **58:1** 84-89.
- (33) Erickson M.C. and Selivonchick D.P. 1988. "A novel method to administer radiolabeled lipid to juvenile oysters". *Lipids.* **23:22-27**.
- (34) Eun Jong-Bang, Hearnberger O. y Kim Jin M. 1993. "Antioxidants, Activators and Inhibitors Affect the Enzymic Lipid Peroxidation System of Catfish Muscle Microsomes". *J. Food Sci.* **58:1** 71-74
- (35) Fennema R. Owen. 1993. *Food Chemistry*. 2th. Ed. Ed. Marcel Dekker. New York.
- (36) Fernandezspla M.D. y Oneill E. 1994. "Lipid oxidation in rabbit meat under different storage conditions". *J. Food Sci.* **58:6** 1262-1264.
- (37) Foster Max L. y González Sharon E. 1992. "Soxtec fat analyzer for deteniination of total fat in meat: collaborative study". *J. AOAC.* **75:2** 288-292.
- (38) Folch J., Lees M y Stanley G.H.S. 1957. "A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues". *J. Biol. Chem.* **226:497-509**.
- (39) Freeman D.W. y Hearnberger J.O. 1994. "Rancidity in Selected Sites of Frozen Catfish Fillets". *J. Food Sci.***59:1** 60-63.
- (40) Fujita Y., Ohsima T. y Koizumi C. 1994. "Increase in the Oxidative Stability of Sardine Lipids Trough Heat Treatment". *Fisheries Sci.* **60:3** 289-294.
- (41) Gaddis A.M., Ellis R. y Currie G.T. 1960. "Carbonyls in oxidizing fat. III. The distribution of volatile and non-volatile carbonyls". *Food Research.* **25:** 495-506.
- (42) Gerrard Frank. 1977. *Meat Technology*. Northwood Publications Ltd. Inglaterra.
- (43) Gray Ian J. y Manahan J. 1992. "Measurement of lipid oxidation in meat and meat products". *Trends in Food Sci. and Technol.* **3:** 315-319.

- (44) Gray J.I. 1978. "Measurement of Lipid Oxidation: A review". *J. Am. Oil Chem. Soc.* **55**:539-546.
- (45) Grima E.M., Medina A.R., Giménez A.G., Pérez J.A.S., Camacho F.G. y Sánchez J.L.G. 1994. "Comparition Between Extraction of Lipids and Fatty Acids from Microalgal Biomass". *J. Am. Oil Chem. Soc.* **71**:9 955-959.
- (46) Gunnlaugsdottir Helga y Ackman Robert G. 1993. "Three extraction methods for determination of lipids in fish meal: evaluation of a hexane:isopropanol method as an alternative of cloroform-based methods". *J. Sci. Food Agric.* **61** 235-240.
- (47) Gunstone F.D. 1993. "Information on the composition of fats from their high-resolution ¹³C nuclear magnetic resonance spectra". *Am. Oil Chem. Soc.* **70**:4 361-365.
- (48) Guntensperger B. y Escher F. 1994. "Effects of Different Processing and Storage Conditions on Lipid Oxidation in Shelf-Stable Meat Products". *Minimal Processing of Foods.* **142** 233.
- (49) Hagan Susie, Murphy Ewoc y Shelley L.M. 1967. "Meat and meat products. Extration of lipids front raw-beef lean by using various solvent systems". *J. AOAC.* **50**:2 250-255.
- (50) Handumrongkul C. y Silva J.L. 1994. "Aerobic counts, color and adenine nucleotide changes in CO₂ packed refrigerated striped bass strips". *J. Food Sci.* **59**:1 67-69.
- (51) Hardy R., Mc. Gill A.S. y Gunstone F.D. 1979. "Lipid and autooxidative changes in cold stored cod". *J. Food Agric.* **30**:999-1001.
- (52) Hara A. and Radin N.S. 1978. "Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent". *Anal. Biochem.* **90**: 420-426.
- (53) Harris W.S., Windsor S.L. y Caspermeyer J.J. 1994. "Modification of lipid-related atherosclerosis risk factors by omega 3 fatty acid ethyl esters in hypertriglyceridemic patients". *J. Nutritional Biochem.* **4**:12 706-712.
- (54) Hart Leslie F. 1991. *Análisis Moderno de los Alimentos.* Ed. Acribia. México.
- (55) Henick A.S., Benca M.F. y Mitchel J.H. 1954. "Estimating carbonyl compounds in rancid fats and foods". *J. Am. Oil Chemists Soc.* **31**:88-91.
- (56) Hobart H. Willard, Merrit, Dean y Settle. 1991. *Métodos Instrumentales de Análisis.* Ed. Iberoamericana. USA.
- (57) Holm U., Ekbohm K. y Wode G. 1957. "Determination of the extend of oxidation of fats". *J. Am. Oil Chemists Soc.* **34**: 606-609.

- (58) Hopia Anu I., Lampi Anna-Maija, Piironen Vieno I., Hyvonen Lea E.T. y Koivistoinen Pekka E. 1993. "Application of high-performance size-exclusion chromatography to study the autoxidation of unsaturated triacylglycerols". *Am. Oil Chem. Soc.* **70:8** 779-784.
- (59) Hopia Anu I., Piironen Vieno I., Koivistoinen Pekka E. y Hyvonen Lea E.T. 1992. "Analysis of lipid classes by solid-phase extraction and high-performance size-exclusion chromatography". *J. Am. Oil Chem. Soc.* **69:8** 772-776.
- (60) Huang Y.W., Lovell R.T. y Dunham R.A. 1994. "Carcass Characteristics of Channel and Hybrid Catfish, and Quality Changes during Refrigerated Storage". *J. Food Sci.* **59:1** 64-66.
- (61) Iturbe Chiñas F. A. y Valdivia M. de los A. 1993. "Análisis Fisicoquímico de Alimentos". Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.
- (62) Joshi N.S. y Thakar P.N. 1994. "Methods to evaluate deterioration of milk fat - a critical appraisal". *J. Food Sci. and Technol.* **31:3** 181-196.
- (63) Karastogiannidou Calliope y Ryley Janice. 1994. "The recovery of added malodialdehyde from rancid chicken by distillation method for thiobarbituric acid-reactive substances". *International J. Food Sci. and Technol.* **29:19-22**.
- (64) Ke P.J. y Ackman R.G. 1976. "Metal-catalyzed oxidation in mackerel skin meat lipids". *J. Am. Oil Chem. Soc.* **53:** 636-640.
- (65) Ke P.M., Ackman R.G., Linke B.A. y Nash D.M. 1977. "Differential lipid oxidation in various parts of frozen mackerel". *J. Food Technol.* **12:**37-40.
- (66) Khayat A. y Shwall D. 1983. "Lipid oxidation in seafood". *Food Technol.* **37:**130-140.
- (67) Knor H.T. and Chan S.L. "Comparative studies of three solvent mixtures for the extraction of soybean lipid". 1985. *Am. Oil Chem. Soc.* **62:1** 98-99.
- (68) Kraft A.A. 1994. "Storage stability of low-fat ground beef". *J. Food Sci.* **59:4** R2.
- (69) Labuza Theodore P. 1971. "Kinetics of Lipid Oxidation in Foods". *Food Technol.* **32:** 355-405.
- (70) Labuza Theodore P. 1980. "The effect of Water Activity on Reaction Kinetics of Food Deterioration". *Food Technol.* **22:**36-41.

- (71) Lang J., Celotto C. y Isterbauer H. 1985. "Quantitative determination of the lipid peroxidation product 4-hidroxyonenal by HPLC". *Anal. Biochem.* **150**:2 369-378.
- (72) Lea C.H. 1952. "Methods for determining peroxide in lipids". *J.Sci. Food Agr.* **3**: 586-594.
- (73) Lea C. H. y Swoboda P.A.T. 1958. "The flavor of aliphatic aldehydes". *Chem. and Ind.* **40**:1289-1290.
- (74) Lento H.G. and Daugherty C.E. 1980. 94th Annual Meeting of The AOAC Washington, DC. Abatract 80.
- (75) Longman y De Bussy J.H. 1975. *Materials and Technology. Oils, fats and animal food products, etc.* Ed. L.W. Ladd M.A y col.. Vol. VIII . London.
- (76) Lorenzen Thomas J. y Anderson Virgil L. 1993. *Design of Experiments.* Marcel Dekker Inc. United States of American.
- (77) Lovaas Erick. 1992. "A sensitive spectrophotometric method for lipid hydroperoxide determination". *J. Am. Oil Chem. Soc.* **69**:8 777-783.
- (78) Loury M. 1972. "Possible mecanisms of autoxidative rancidity". *Lipids.* **7**: 671-675.
- (79) Lundberg, W.O. 1962. "Mechanisms" in *Lipids and their oxidation.* Schultz H. W., Day E.A. y Sinnhuber R.O. Ed. The AVI Pub. Co., Inc. Westport, Con. pp 31-50.
- (80) Mabrouk A.F. 1964. "The Kinetics of Methyl Linoleate Emulsion Auotoxidation in presence of Polyhydroxy compounds". *J. Am. Oil Chem. Soc.* **44**: 331-334.
- (81) Maloney J.F., Labuza T.P., Wallace D.H. y Karel M. 1966. "Autoxidation of methyl linoleate in a freeze-dried model system. I. Effec of water on the autocatalyzed oxidation". *J. Food Sci.* **31**: 878-882.
- (82) Marshall A.C., Sams A.R. y Elswyk M.E. 1994. "Oxidative Stability and Sensory Quality of Stored Eggs From Hens Fed 1.5% Menhaden Oil". *J. Food Sci.* **59**:3 561-563.
- (83) Matthaus B., Wiezorek C. y Eichner K. 1994. "Fast chemiluminescence method for detection of oxidized lipids". *Fat Sci. Technol.* **96**:3 95-99.
- (84) McCord Joe M. 1994. "Free radicals and prooxidants in health and nutrition". *Food Technol.* **May.** 106-111.
- (85) McMillin K.W., Binder T.D., Felchle S.E., Dugas S.M. y Koh K.C. 1991. "Flavor and oxidative stability of ground patties as affectetd by source and storage". *J. Food Sci.* **56**:899-902.

- (86) Melton S.L. 1983. "Methodology for following lipid oxidation in muscle foods". *Food Technol.* **37**:105-116.
- (87) Mendenhall V.T. 1972. "Oxidative rancidity in raw fish fillets harvested from the Gulf of Mexico". *J. Food Sci.* **37**:547-550.
- (88) Mielche M.M. y Bertelsen G. 1995. "Approaches to Prevention of Warmed - over Flavour". *Trends in Food Sci. and Technol.* **5**:10 322-327.
- (89) Miki H., Nishimoto M. y Shindo J. 1994. "Oxidation rate of lipid in fish muscles during storage at low storage temperature". *Nippon Suisan Gakkaishi.* **60**:4 509-513.
- (90) Mills A. 1975. "Measuring changes that occur during frozen storage of fish: a review". *J. Food Technol.* **10**:5 483-496.
- (90) Miyashita Kazuo y Takagi Toru. 1988. "Autooxidation rates of various esters of safflower oil and linoleic acid". *J. Am. Oil Chem. Soc.* **65**:7 1156-1158.
- (91) Morrison R.T. y Boyd R.N. 1976. *Química Orgánica*. Fondo Educativo Interamericano. USA.
- (92) Nelson G.J. 1991. "Isolation and purification of lipids from biological matrices". *Anal. of Fats, Oils and Lipoproteins.* **20**-59.
- (93) Norma Oficial Mexicana para alimentos- aceites y grasas vegetales o animales- determinación del índice de peróxido, Nom-F-154-1987.
- (94) O'Connor R.J. 1956. "Application of infrared spectrophotometry to fatty acid derivatives". *J.AOCS.* **33**:1.
- (95) Ohba R., Nakashima Y. y Ueda S. 1994. "Solubilization of proteins for clarification of egg yolk powder suspensions and separation of lipids using enzymes". *J. Fermentation and Bioengineering.* **78**:2 197-199.
- (96) Osawa T. y Shibamoto T. 1992. "Analysis of free malonaldehyde formed in lipid peroxidation systems via a pyrimidine derivate". *J. Am. Oil Chem. Soc.* **69**:5 466-468.
- (97) Oteiza Patricia I. 1993. "A mechanism for the stimulatory effect of aluminium on iron-induced lipid peroxidation". *Archives Biochem. and Biophysics.* **308**:2 374-379.
- (98) Paraskevopoulou A. y Kiosseglou V. 1994. "Cholesterol and other lipid extractipn from egg yolk using organic solvents: Effects on functional properties of yolk". *J. Food Sci.* **59**:4 766-768.

- (99) Paquot C. y Mercier J. 1957. "Iodometric determination of the peroxide number". *Inds. parfum.* **12**:330-333.
- (100) Patton S., Keeney M. y Kurtz G.W. 1951. "Compounds producing the Kreis color reaction with particular reference to oxidized milk fat". *J.AOCS.* **28**:391.
- (101) Pearson A.M., Gray J.I., Wolzak Arlene M. y Horenstein N.A. 1983. "Safety implications of oxidized foods". *Food Technol.* July 121-129.
- (102) Pikul J., Leszczynski D.E. y Kummerou F.A. 1989. "Evaluation of three modified TBA methods for measuring lipid oxidation in chicken meat". *J. Agric. Food Chem.* **35**:5 1309-1313.
- (103) Pudel V. 1994. "What does the Consumer Expect from the Quality of Food. Especially Meat Products". *Drutsche Tierarztliche Wochenschrift.* **101**:7 255-258.
- (104) Quast D. y Karel M. 1972. "Computer simulation of storage life of foods undergoing two interactive mechanisms". *J. Food Sci.* **37**: 679-682.
- (105) Radin N.S. 1981. "Extraction of tissues lipids with a solvent of low toxicity". *Methods in Enzimol.* **72**:5-7.
- (106) Raharjo S., Sofos J.N. y Schmidt G.R. 1993. "Solid-phase extraction improves thiobarbituric acid method to determine lipid oxidation". *J. Food Sci.* **58**:4 921-924.
- (107) Ravindranath B. 1989. *Principles and Practice of Chromatography.* Ed. Ellis Horwood. New York. USA.
- (108) Rhee K.S. 1978. "Minimization of further lipid peroxidation in the distillation of TBA test of fish and meat". *J. Food Sci.* **43**:1776-1778.
- (109) Richard M.J., Guiraud P., Meo J. y Favier A. 1992. "High-performans liquid chromatographic separation of malonaldehyde-thiobarbituric acid adduct in biological materials (plasma and human cells) using a commercially available reagent". *J. Chromatography.* **577**: 9-18.
- (110) Rockland Louis B. y Nishi Susan K. 1980. "Influence of water activity on food product quality and stability". *Food Technol.* **Abril** 40-51.
- (111) Roozen J.P., Frankel E.N. y Kinsella J.E. 1994. "Enzymic and Autoxidation of Lipids in Low Fat Foods - Model of linoleic acid in emulsified triolein and vegetable oils". *Food Chem.* **50**:1 39-43.
- (112) Rossell J.B. y Pritchard J.L.R. 1991. *Analysis of oil seeds, fats and fatty food.* Ed. Elsevier. New York.

- (113) Sallany Saari A., Guan Ming Der, Manwaring John D. y Addis Paul B. 1984. "Free malonaldehyde determination in tissues by high-performan liquid chromatography". *Anal. Biochem.* **142**:277-283.
- (114) Sahasrabudhe M.R. y Smallbone B.W. 1983. "Comparative evaluation of solvent extraction methods for the determination of neutral and polar lipids in beef". *J. Am. Oil Chem. Soc.* **80**:4 801-805.
- (115) Salih, A.M., Smith, D.M., Price, J.F. y Dawson, L.E. 1987. "Modified extraction 2-thiobarbituric acid method for measuring lipid oxidation in poultry". *Poultry Sci.* **66**:1483-1488.
- (116) Sando Charles E. 1928. "Lipides and their estimation in vegetable tissues". *Plant Physiol.* **3**: 155-184.
- (118) Sato Tetsuo, Kawano Sumio y Iwamoto Mutsuo. 1991. "Near infrared spectral patterns of fatty acid analysis from fats and oils". *J. Am. Oil Chem. Soc.* **68**:1 827-833.
- (119) Shahidi F. y Hong C. 1991. "Evaluation of malonaldehyde as a maker of oxidative rancidity in meat products". *J. Food Biochem.* **15**:2 97-105
- (120) Shanta N.C., Crum A.D. y Decker E.A. 1994. "Evaluation of conjugated linoleic acid concentration in cooked beef". *Food Technol.* **43**: 1757-1760
- (121) Shantha N.C. y Decker E.A. 1994. "Rapid sensitive, iron-based spectrophotometric methods for determination of peroxide values of food lipids". *J. AOAC International.* **77**:2 421-424.
- (122) Shenouda Soliman Y.K. 1980. "Theories of protein denaturation during frozen storage of fish flesh". *Advances in Food Research.* **26**: 275-306.
- (123) Siu G.M. y Draper H.H. 1978. "A survey of the malonaldehyde content of retail meats and fish". *J. Food Sci.* **43**: 1147-1149.
- (124) Smith P., Ambrose M.E. and Knobl G.N. 1964. "Improved rapid method for determining total lipids in fish meal". *Comm. Fish. Rev.* **26**:1-5.
- (125) Srikar L.N., Seshadari H.S. y Fazal A.A. 1989. "Changes in lipids and proteins of marine catfish (*Tachysurus dussumieri*) during frozen storage". *J. Food Sci.* **24**:6 653-658.
- (126) Stangelo A.J. y James C. 1993. "Analysis of lipids from cooked beef by thin-layer chromatography whit flame-ionization detection". *J. Am. Oil Chem. Soc.* **70**:12 1245-1250.

- (127) Stansby Maurice E. Fish Oils and Nutrition. 1990. The AVI book. Ed. Van Nostrand Reinhold. New York.
- (128) Stine C.N., Harland H.A., Coulter S.T. y Jenness R. 1954. "Determination of rancidity in lipids" J. Dairy Sci. 37:202.
- (129) Takahashi Y., Miyachi J., Ogino T. y Kimura J. 1995. "Analysis of Ether Soluble Components in Undaria pinnatifida". Nippon Suisan Gakkaishi. 60:3 371-375.
- (130) Tarladgis B.G., Pearson A.M. y Dugan L.R. 1962. "Chemistry of the 2-thiobarbituric acid test for determination of oxidative rancidity in foods. If formation of the TBA malonaldehyde complex without acid-heat treatment". J.Sci. Food Agric. 15: 602-607.
- (131) Tarladgis B.G., Watts B.M. y Younathan M.T. 1960. "A distillation method for the quantitative determination of malonaldehyde in rancid foods". J. Am. Oil Chem. Soc. 37:44 48.
- (132) Teruo Miyazawa, Minoru Kashima y Kenshiro Fujimoto. 1993. "Fluorometric Peroxygenase Assay for Lipid Hydroperoxides in Meats and Fish". J. Food Sci. 58:1 66-70.
- (133) Theodet C. y Gandemer G. 1994. "Fate of Lipids During Whey Defatting Process" Lait. 74:4 281-295.
- (134) Tichivagana J.Z. y Morrissey P.A. 1982. "Lipid oxidation in cooked fish muscle". J. Food Sci. and Technol. 6:2 157-164.
- (135) Tsoukalas Basile y Grosch Werner. 1977. "Analysis of Fat Deterioration-Comparison of Some Photometric Tests". J. Am. Oil Chem. Soc. 54:490-493.
- (136) Trombly R. y Trappel A. 1975. "Fractionation and analysis of fluorescent products of lipid peroxidation". Lipids. 10:8 441-447.
- (137) Uchiyama Mitsuru y Mihara Midori. 1977. "Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test". Anal. Biochem. 86: 270-277.
- (138) Vandervoort F.R., Ismail A.A., Sedman J. y Emo G. 1994. "Monitoring the oxidation of edible oils by fourier transform infrared spectroscopy". J. Am. Oil Chem. Soc. 71:3 243-253.
- (139) Van Elswyk M.E., Sams A.R. y Hargis P.S. 1992. "Composition, functionality and sensory evaluation of eggs from hens fed dietary menhaden oil". J. Food Sci. 57:342-344.
- (140) Wainman B.C. y Lean D.R.S. 1994. "Methodological concerns in measuring the lipid fraction of Carbon fixation". Hydrobiologia. 273:2 111-120.

- (141) Warren M.W., Brown H.G. y Davis D.R. 1988. "Solvent extraction of lipid components from egg yolk solids". J. Oil Chem. Soc. 65:7 1136-1138.
- (142) Watts B.M. 1962. "Meat products" in Lipids and their oxidation (Schultz H.W., Day E.A. y Sinnhuber R.O. eds) The AVI Pub.Co., Inc. Westport, Con. pp 202-214.
- (143) Weinling Heinz. Tecnología Práctica de la carne. 1973. Ed.Librería General. España.
- (144) Willard Hobart H., Merritt, Dean y Settle. 1991. Métodos Instrumentales de Análisis. Ed. Iberoamericana. México.
- (145) Witte V.C. Krause G.F. y Bailey M.E. 1970. "A new extraction method for determining 2-tiobarbituric acid values of pork and beef during storage". J. Food Sci. 35:582-585.
- (146) Yu T.C. y Sinnhuber R.O., 1967. "An improved 2-Thiobarbituric Acid (TBA) Procedure for the Measurement of Autoxidation in Fish Oils". J. Am. Oil Chem. Soc. 44:256-259.
- (147) Zotos A., Hole M. y Smith G. 1995. "The effect of frozen storage of mackarel (*Scomber scombrus*) on its quality when hot-smoked". J. Sci. Food and Agric. 67:1 43-48.

APENDICE .

1. Efecto del disolvente de extracción en la cuantificación de lípidos totales en carne molida comercial de res.

Método de extracción de lípidos: Bligh y Dyer

Tabla 1. Lípidos totales en carne molida comercial de res (%)

REPETICIONES	DICLOROMET.:MET.	ETER ETILICO
1	7.60	6.81
	7.61	6.84
2	7.81	6.88
	7.76	6.96
3	7.68	6.82
	7.70	6.89
	X = 7.70	X = 6.87
	SD = 0.1	SD = 0.06

Análisis estadístico

Tabla 2

CUADRADO LATINO Lípidos totales de carne molida comercial de res							
CUADRADO LATINO							
Fte. de Var.	g. l.	S cuad.	C medio	F calc.		F tab (0.05)	F tab (0.01)
V1 disolvente	1	2.2794	2.2794	374.4394	**	5.32	11.26
V2 repetición	2	0.0111	0.00555	0.911704	N.S.	4.46	8.65
Error	8	0.0487	0.006087				
Total	11	2.3392					
C. L. EN BLOQUES							
V1 disolvente	1	2.2794	2.2794	334.5031	**	5.59	12.25
V2 repetición	2	0.0111	0.00555	0.814465	N.S.	4.74	9.55
Duplicado	1	0.001	0.001	0.146750	N.S.	5.59	12.25
Error	7	0.0477	0.006814				
Total	11	2.3392					
E.R. = 0.87349173							

2. Efecto del disolvente de extracción en los índices de oxidación de lípidos en carne molida comercial de res.

Método de extracción de lípidos: Bligh y Dyer.

a) Índice de Peróxido en carne molida comercial de res.

- Método de la AOAC.

Tabla 3. Índice de Peróxido en carne molida comercial de res (meq/kg muestra)

REPETICIONES	DICLOROMET./MET. (1:1)	ETER ETILICO
1	0.23	0.10
	0.27	0.10
2	0.25	0.11
	0.23	0.10
3	0.24	0.11
	0.22	0.11
	X = 0.24	X = 0.105
	SD = 0.01	SD = 0.005

- Método Colorimétrico.

Tabla 4. Índice de Peróxido en carne molida comercial de res (meq/Kg muestra)

REPETICIONES	DICLOROMET./MET. (1:1)	ETER ETILICO
1	0.89	0.32
	0.82	0.29
2	0.90	0.33
	0.93	0.32
3	0.86	0.29
	0.84	0.32
	X = 0.87	X = 0.31
	SD = 0.04	SD = 0.017

Análisis estadístico.

Tabla 5.

<i>CUADRADO LATINO</i> Índice de peróxido de carne molida comercial de res							
<i>CUADRADO LATINO</i>							
Fte. de Var.	g. l.	S cuad.	C medio	F calc		F tab (0.05)	F tab (0.01)
V1 método	1	1.6037	1.6037	19.71237	**	4.35	8.10
V2 disolvente	1	0.9749	0.9749	11.98328	**	4.35	8.10
V3 repetición	2	0.0012	0.0006	0.007375	N.S.	3.49	5.85
Error	20	1.6271	0.081355				
Total	23	2.6032					
<i>C. L. EN BLOQUES</i>							
V1 método	1	1.6037	1.6037	18.73020	**	4.38	8.18
V2 disolvente	1	0.9749	0.9749	11.38621	**	4.38	8.18
V3 repetición	2	0.0012	0.0006	0.007007	N.S.	3.52	5.93
Duplicado	1	0.0003	0.0003	0.003503	N.S.	4.38	8.18
Error	19	1.6268	0.085621				
Total	23	2.6032					
E.R. = 0.94606188							

b) Índice de TBA en carne molida comercial de res.

Tabla 6.

Índice de TBA en carne molida comercial de res

<i>REPETICIONES</i>	<i># TBA (mg MA/kg de muestra)</i>
1	1.35
	1.33
	1.48
	X = 1.38
	SD = 0.08

Por tratarse de una prueba en la que no se necesita la extracción del material lipídico no se estudió el efecto del disolvente sobre el valor de TBA

c) Índice de Kreis en carne molida comercial de res

Tabla 7. Índice de Kreis en carne molida comercial de res (IK/g muestra)

REPETICIONES	DICLOROMET./MET. (1:1)	ETER ETILICO
1	0.101	0.083
	0.103	0.082
2	0.101	0.083
	0.105	0.082
3	0.099	0.079
	0.100	0.077
	X = 0.101	X = 0.081
	SD = 0.002	SD = 0.002

Análisis estadístico.

Tabla 8.

CUADRADO LATINO Índice de Kreis en carne molida comercial de res							
CUADRADO LATINO							
Fte. de Var.	g. l.	S cuad.	C medio	F calc.		F tab (0.05)	F tab (0.01)
V1 disolvente	1	0.001260	0.001260	650.7096	**	5.32	11.26
V2 repetición	2	0.000038	0.000019	9.806451	*	4.46	8.65
Error	8	1.55E-05	1.9375E-06				
Total	11	0.001314					
C. L. EN BLOQUES							
V1 disolvente	1	0.001260	0.001260	598.3220	**	5.59	12.25
V2 repetición	2	0.0111	0.000019	9.016949	*	4.74	9.55
Duplicado	1	0.001	7.5E-07	0.355932	N.S.	5.59	12.25
Error	7	0.0477	2.1071E-07				
Total	11	2.3392					
E.R. = 0.89905838							

3. Efecto del disolvente de extracción en la cuantificación de lípidos totales en sardina mexicana.

Método de extracción de lípidos: Bligh y Dyer.

Tabla 9. Lípidos totales en sardina mexicana (%)

REPETICIONES	DICLOROMET.:MET.	ETER ETL-100
1	8.39	9.60
	8.41	9.71
2	8.30	9.58
	8.33	9.48
3	8.44	9.51
	8.40	9.69
	X = 8.38	X = 9.60
	SD = 0.053	SD = 0.092

Análisis estadístico.

Tabla 10.

CUADRADO LATINO Lípidos totales de sardina mexicana							
CUADRADO LATINO							
Fte. de Var.	g. l.	S cuad.	C medio	F calc.		F tab (0.05)	F tab (0.01)
V1 disolvente	1	4.4408	4.4408	1124.253	**	5.32	11.26
V2 repetición	2	0.0253	0.01265	3.202531	N.S.	4.46	8.65
Error	8	0.0316	0.00395				
Total	11	4.4977					
C. L. EN BLOQUES							
V1 disolvente	1	4.4408	4.4408	1098.431	**	5.59	12.25
V2 repetición	2	0.0253	0.01265	3.128975	N.S.	4.74	9.55
Duplicado	1	0.0033	0.0033	0.816254	N.S.	5.59	12.25
Error	7	0.0283	0.004042				
Total	11	4.4977					
E.R. = 0.95531998							

4. Efecto del disolvente de extracción en los índices de oxidación de lípidos en sardina mexicana.

Método de extracción de lípidos: Bligh y Dyer.

a) Índice de Peróxido en sardina mexicana.

- Método de la AOAC.

Tabla 11. Índice de Peróxido en sardina mexicana (meq/Kg muestra)

<i>REPETICIONES</i>	<i>DICLOROMET.MET. (1:1)</i>	<i>ETER ETILICO</i>
1	7.56	10.81
	7.56	10.62
2	8.32	11.44
	7.49	11.44
3	7.15	10.56
	8.42	11.04
	X = 7.75	X = 10.99
	SD = 0.50	SD = 0.39

Análisis estadístico.

Tabla 12.

<i>CUADRADO LATINO</i> Índice de Peróxido en sardina mexicana (AOAC)							
<i>CUADRADO LATINO</i>							
Fte. de Var.	g. l.	S cuad.	C medio	F calc.		F tab (0.05)	F tab (0.01)
V1 disolvente	1	28.9541	28.9541	145.3792	**	5.32	11.26
V2 repetición	2	0.2353	0.11765	0.590723	N.S.	4.46	8.65
Error	8	1.5933	0.19916				
Total	11	30.7827					
<i>C. L. EN BLOQUES</i>							
V1 disolvente	1	28.9541	28.9541	127.2148	**	5.59	12.25
V2 repetición	2	0.2353	0.11765	0.516915	N.S.	4.74	9.55
Duplicado	1	0.0001	0.0001	0.000439	N.S.	5.59	12.25
Error	7	1.5932	0.2276				
Total	11	30.7827					
E.R. = 0.85560926							

- Método Colorimétrico.

Tabla 13. Índice de Peróxido en sardina mexicana (meq/Kg muestra)

REPETICIONES	DICLOROMET./MET. (1:1)	ETER ETILICO
1	24.13	30.11
	23.55	29.43
2	24.30	28.20
	22.68	29.50
3	22.94	28.61
	23.33	28.70
	X = 23.49	X = 29.00
	SD = 0.64	SD = 0.80

Análisis estadístico.

Tabla 14.

CUADRADO LATINO Índice de Peróxido en sardina mexicana (método colorimétrico)							
CUADRADO LATINO							
Fte. de Var.	g. l.	S cuad.	C medio	F calc.		F tab (0.05)	F tab (0.01)
V1 disolvente	1	94.192	94.192	268.2004	**	5.32	11.26
V2 repetición	2	1.7426	0.8713	2.480922	N.S.	4.46	8.65
Error	8	2.8096	0.3512				
Total	11	98.7442					
C. L. EN BLOQUES							
V1 disolvente	1	94.192	94.192	243.4081	**	5.59	12.25
V2 repetición	2	1.7426	0.8713	2.251587	N.S.	4.74	9.55
Duplicado	1	0.1008	0.1008	0.260484	N.S.	5.59	12.25
Error	7	2.7088	0.38697				
Total	11	98.7442					
E.R. = 0.88739253							

b) Índice de TBA en sardina mexicana.

Tabla 15.

<i>REPETICIONES</i>	<i># TBA (mg MA/kg de muestra)</i>
1	86.00
	85.93
	81.00
	81.40
2	82.80
	77.80
	88.20
3	70.73
	70.20
4	79.68
	84.72
	77.52
	76.80
5	85.92
	79.44
	79.68
	77.28
	X = 80.3
	S.D. = 5.09

Por tratarse de una prueba en la que no se necesita la extracción del material lipídico no se estudió el efecto del disolvente sobre el valor de TBA.

c) Índice de Kreis en sardina mexicana.

Tabla 16. Índice de Kreis en sardina mexicana (IK/g muestra)

REPETICIONES	DICLOROMET./MET. (1:1)	ETER ETILICO
1	13	14
	9	12
	9	15
2	13	18
	8	21
	11	19
	X = 10.50	X = 16.50
	SD = 2.10	SD = 3.40

Análisis estadístico.

Tabla 17.

CUADRADO LATINO Índice de Kreis en sardina mexicana							
CUADRADO LATINO							
Fte. de Var.							
V1 disolvente	g. l.	S cuad.	C medio	F calc.		F tab (0.05)	F tab (0.01)
V2 repetición	1	108	108	18	**	5.12	10.56
Error	1	27	27	4.5	N.S.	5.12	10.56
	9	54	6				
Total	11	189					
C. L. EN BLOQUES							
V1 disolvente	g. l.	S cuad.	C medio	F calc.		F tab (0.05)	F tab (0.01)
V2 repetición	1	27	27	4.108695	N.S.	5.50	12.25
Triplicado	2	8	4	0.608695	N.S.	4.74	9.55
Error	7	46	6.571428				
Total	11	189					
E.R. = 0.87652174							