



Universidad Nacional Autónoma de México

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

**PROCEDIMIENTO MEJORADO PARA LA EVALUACION DE
RANCIDEZ EN PESCADO, EN BASE A LA FORMACION
DE SUBSTANCIAS REACTANTES CON ACIDO
TIOBARBITURICO.**

T E S I S

**Que para obtener el Título de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

p r e s e n t a

JESUS EDUARDO CERVANTES CUEVAS

1 9 8 5

CUAUTITLAN IZCALLI, ESTADO DE MEXICO.



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 está 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.

I N D I C E

- I.- RESUMEN
- II.- INTRODUCCION
- III.- EXPERIMENTOS
- IV.- RESULTADOS Y ANALISIS
- V.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES
- VI.- APENDICES
- VII.- BIBLIOGRAFIA

I.- RESUMEN

En este trabajo se ha desarrollado un método mejorado para la determinación del grado de rancidez en pescado. Los compuestos indicadores de rancidez en muestras de pescado, son cuantitativamente reaccionados con el ácido 2-tiobarbitúrico, digeridas y separadas directamente -- por medio de una destilación específica y estimadas en una medición espectrofotométrica a 538 nm.

Han sido investigados los errores operacionales, interferencias y recuperación de carbonilos volátiles de este procedimiento. La técnica recomendada ha sido empleada satisfactoriamente para varias evaluaciones de calidad en pescado con una desviación total de 7% y con un límite de detección de 5.2 nanomoles de sustancias reactantes -- con el ácido tiobarbitúrico (SRATB) en una muestra de 10 g de carne de pescado. El procedimiento específico del método mencionado, es descrito para de esta forma aplicarlo a productos pesqueros ya sean frescos o congelados.

II.- INTRODUCCION

Durante años se han hecho una gran cantidad de esfuerzos para determinar el grado de rancidez en alimentos grasos por medio de un método químico adecuado. Desde 1944 se observó (19), que tejidos animales que habían sido incubados aeróbicamente, daban una coloración con el ácido 2-tiobarbitúrico (ATB). Bernheim y colaboradores (3) encontraron que este color era el resultado de un complejo formado de la reacción entre productos de oxidación de compuestos grasos insaturados y el ácido 2-tiobarbitúrico.

Como es bien conocido, los productos primarios de la oxidación de lípidos son hidroperóxidos, los cuales se descomponen rápidamente por medio de reacciones secundarias, originando nuevos compuestos, en particular compuestos carbonilos (9, 10, 11, 16, 29, 30).

Se ha encontrado que en el transcurso de la oxidación, la cantidad de sustancias reactantes con ácido 2-tiobarbitúrico (SRATB) varían linealmente con la conjugación diénica y con el consumo de oxígeno (8, 31). Por otro lado, dienos y monoenos pueden no producir SRATB. Adicionalmente, ha sido demostrado que fragmentos de tres carbonos derivados de la oxidación poliénoica eran los compuestos productores del color, siendo malonaldehído (MA) la principal SRATB, estudio basado en curvas espec-

trales (3, 35, 36, 43). En otras palabras, malonaldehído o SRATB son formados principalmente de la oxidación de ácidos grasos conteniendo tres o más dobles ligaduras (21, 23, 42). Las otras SRATB que acompañan al MA no han sido bien identificadas (20), pero parecen ser precursores estables de MA, posiblemente vinyl-cetonas, 2, 4-dienales y/o 2, 4, 7-decatrienales (14, 20, 32, 36). Además, es ampliamente aceptado que el pigmento rojo formado en la reacción con ácido 2-tiobarbitúrico es el producto de la condensación (en una reacción inducida en medio ácido y calentamiento) de 1 mol de MA y 2 moles de ATB (13, 28, 36, 42).

En años anteriores se desarrollaron varios métodos para la aplicación de la prueba del ATB en productos alimenticios (4, 23, 27, 33, 34, 35, 37, 40, 41). Estos métodos pueden clasificarse bajo dos categorías:

a) Por medio de una extracción.- Al producto alimenticio se le añade una solución ácida de ATB y ensayada se calienta en baño maría para de este modo obtener el máximo desarrollo de color, extrayendo entonces el pigmento con un solvente adecuado y midiéndolo espectrofotométricamente.

b) En base a una destilación.- El alimento se

destila bajo condiciones ácidas, se toma una alícuota del destilado y se le adiciona ATB, enseguida se calienta y el color desarrollado se mide directamente en un espectrofotómetro.

Como se puede observar, los dos métodos coinciden en que ambos emplean calentamiento de la muestra a un pH ácido. Sin embargo, el procedimiento en base a una destilación ofrece ventajas sobre el de extracción; a). Separación de las SRATB enlazadas con aminoácidos, proteínas, glicógeno y otros constituyentes del alimento (22); b). Mejor remoción de SRATB de sustancias interferentes (40); c). Menor oxidación lipídica durante la prueba misma (40); d). Las SRATB son obtenidas en una solución acuosa transparente, de forma que el producto de reacción con ATB no necesita ser extraído con solvente alguno (37); e). Los constituyentes volátiles de la muestra son destilados, evitando así cualquier reacción del ATB con constituyentes no-volátiles del alimento (27, 38); f). La relación del olor rancio con las SRATB y otros componentes volátiles puede ser fácilmente estudiada en los translúcidos destilados (37); g). Con este método se eluden un gran número de operaciones individuales (27).

La principal desventaja del método de destila--

ción es que presenta una menor recuperación de MA en los destilados, la cual está alrededor del 65% usando tetraetoxipropano como estándar (4, 35, 37, 40).

Otra desventaja de este método, es que pueden ser formados dos colores: uno rojo (en el cual se fundamenta el método), con una absorbancia máxima a 530-540 nm y otro amarillo (considerado como una interferencia) de absorbancia máxima a 450 nm, siendo el color rojo de condición estable mas no así el amarillo. Se ha deducido que esta coloración es causada por algunos carbonilos, los cuales pueden ser diferentes productos de descomposición de hidroperóxidos debido a una oxidación más severa (2) o a causa de impurezas en los reactivos (42). Sin embargo, se encontró que calentando el destilado-ATB a temperaturas cercanas al punto de ebullición del agua durante menos de una hora, la formación de estas coloraciones amarillentas puede evitarse (26).

MA en solución acuosa (no-volátil) podría ser convertido a su isómero volátil únicamente con acidificación, pero es necesario un medio ácido y calentamiento para separarlo de su unión con proteínas, además de que la máxima recuperación de MA y SRATB se consigue en medio ácido (22, 40). Por otro lado, ha sido probado que el --

tratamiento ácido-calor no es necesario para la condensación de ATB con MA ni para el máximo desarrollo de color; esto significa que el MA libre puede ser medido directamente en el destilado, basándose en que los aldehidos pueden reaccionar con ATB a temperatura ambiente, pero esta técnica requiere una gran cantidad de tiempo (39).

Por lo mencionado con anterioridad, y en base a que se considera imprescindible lograr una separación máxima de las SRATB de su unión con constituyentes alimenticios para de esta forma alcanzar un indicador objetivo de la calidad, el principal propósito de este estudio es mejorar el método de Tarlagdis y colaboradores (37) en base a una modificación del aparato de destilación usado, tratando de lograr la separación completa de las SRATB enlazadas y de otros compuestos carbonilos que pudieran producir interferencias en la coloración final. Adicionalmente a esta modificación, se propone el uso de antioxidantes y agentes quelantes para evitar al máximo resultados erróneos por oxidación extra durante la prueba.

III.- EXPERIMENTOS

A) OBTENCION Y PREPARACION DE LAS MUESTRAS.

Fueron usados para esta investigación macarela - (Scomber scombrus), arenque (Alosa sapidissima), bacalao - (Gadus macrocephalus), atún (Thunnus thynnus) y "redfish" (Sciaenops ocellata), capturados en las afueras del puerto de Halifax.

El pescado fue fileteado, homogenizado y almacenado a -40°C en cajas de plástico de 50 g. de capacidad. Debe hacerse notar que la piel fue separada del músculo ya que ésta presenta un modelo diferente de oxidación al del músculo (6).

B) APARATOS

Aparato específico de destilación vertical (Figura 1a.), homogenizador virtis 23, baño de agua con termostato, espectrofotómetro (Bausch & Lomb spectronic 100), tubos de ensaye con tapón de rosca de teflón de 15 x 125 mm, matraz volumétrico de 50 ml y matraz redondo de 500 ml que ajuste al aparato de destilación (24/40).

C) PARTE EXPERIMENTAL

El método original de Tarlagdis y colaboradores

consiste en destilar un homogenizado de carne-agua en relación 1:10 p/p la cual es llevada a un pH ácido por medio de la adición de ácido clorhídrico. El aparato de destilación usado por este autor fue el usado comunmente para la determinación de protefna, esto es, el aparato de destilación Kjeldahl.

La temperatura ideal se logra hirviendo en baño maría una mezcla de solución de ATB-destilado, determinando su absorbancia a 538 nm. Los valores de ATB son calculados a partir de una curva estándar hecha en base a una solución de tetraetoxipropano (TEP).

Este procedimiento reportó un 68 % de recuperación usando TEP como estándar, pero debido a que ofrece serias ventajas sobre el método en base a una extracción (mencionadas con anterioridad) se resolvió analizar detalladamente el procedimiento y de esta forma poder localizar las posibles fallas existentes en él.

Se reflexionó primeramente en la capacidad de retención de los compuestos carbonilos volátiles por parte del aparato, concluyéndose que no presentaba las características consideradas ideales para este respecto, esto es, un sistema cerrado para la condensación y una mayor capacidad de reflujo para lograr una separación de componentes

en base a su volatilidad. Por lo anterior se diseñó un -- aparato con una extensión en la columna de destilación uni da al condensador, con la incorporación de una trampa de -- destilación, evitándose las fugas por humidificación de -- las uniones. Este aparato es mostrado en la figura 1a.

Otra consideración de importancia era que en el método original se agregaba una cantidad de HCl suficiente sólo para llevar la mezcla a un pH de 1.5, pero que podía variar durante la destilación y así perder el pH óptimo - para retener a las SRATB en su forma volátil. Debido a - esto se incrementó el volumen de HCl, al que consideramos adecuado para retener la acidez ideal.

Por último, y debido a que en el método original no se tomaba en cuenta el efecto de compuestos pro-oxidantes y a la posible autoxidación sufrida durante la prueba en sí, se hizo una revisión de estudios en este aspecto, - decidiéndose a usar los de Castell y colaboradores, los -- cuales obtuvieron mejores resultados añadiendo propil gaa iato (PG) y EDTA antes de la destilación, reduciendo la -- oxidación durante la prueba (PG) y al efecto de las sales de fierro como prooxidantes (EDTA) (6, 7).

Una vez realizadas las modificaciones menciona- das, el paso siguiente fue la comprobación de su funciona-

lidad, para lo cual se diseñaron una serie de experimentos que se describen a continuación:

a) DETERMINACION DE LA ABSORBANCIA DE MAXIMA SENSITIVIDAD.

Para obtener la longitud de onda a la cual se determinaron en forma subsecuente los valores de SRATB, y debido a que podían variar en relación al instrumento y reactivos usados en esta investigación, se determinaron los espectros de absorción (de 440 a 550 nm) de las coloraciones finales, usando muestras de músculo de macarela así como del estándar TEP.

b) COMPORTAMIENTO Y CUANTIFICACION DE LAS SRATB DESTILADAS.

En este experimento se pretendió conocer el comportamiento espectral del destilado (100 ml), el cual se recolectó en fracciones de 10 ml. cada una, desarrollar el color y determinar las absorbancias de 440 a 550 nm. Por este medio se estableció el volumen al cual se obtuvo el mayor porcentaje de SRATB en el que no se presentó interferencia alguna, ya sea en coloraciones o en compuestos ajenos.

c) PRUEBAS DE RECUPERACION.

Debido a que el 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP) produce malonaldehído (MA) a la temperatura de ebullición del agua, fue escogido para su uso como estándar. Así, y para verificar la autenticidad de la curva estándar de que él es hecha, y al mismo tiempo cuantificar su separación - (y por analogía de las SRATB), se agregaron cantidades específicas de TEP a muestras de macarela y arenque. Para determinar su valor en SRATB y de este modo conocer el porcentaje recuperado.

d) INVESTIGACION DE SUBSTANCIAS INTERFEOTORAS.

Fueron llevadas a cabo pruebas de interferencia para varias sustancias posiblemente presentes (en forma natural o añadidas) en el tejido musculoso del pescado, -- adicionando diferentes cantidades de ellas, las cuales van de 1.0 a 57.0 mg. dependiendo de las características de -- cada una, a porciones de 10 g. de macarela y así determinar su influencia en los valores de SRATB.

Por otra parte, para verificar si producen interferencia en la estimación de SRATB (incrementando la -- concentración del color), se determinaron los espectros de absorción (de 440 a 550 nm) de compuestos similares a los formados en una típica reacción de oxidación, tales como -- monoaldehídos y monocetonas.

e) APLICACION DEL METODO EN LA EVALUACION DE
LA CALIDAD EN PESCADO.

Las SRATB son el producto de varias reacciones de rancidez oxidativa de algunos compuestos grasos insaturados. Ciertos estudios cinéticos bajo varias temperaturas de congelación han sido reportados con anterioridad -- (16), evidenciando que ciertas autooxidaciones siguen tomando lugar aun cuando el pescado es almacenado a una temperatura de -40°C , debido principalmente a varios compuestos prooxidantes y a trazas de metales de transición presentes en el tejido del pescado (6, 7, 15, 18).

Las variaciones de valores de SRATB para atún, macarela y "redfish" (frescos), mantenidos a temperaturas de -2 , -15 y -30°C , fueron determinadas para así poder -- calcular el valor de este método en la vida de anaquel -- del pescado.

IV.- RESULTADOS Y ANALISIS

a) DETERMINACION DE LA ABSORBANCIA DE MAXIMA SENSITIVIDAD.

Analizando los espectros obtenidos, tanto del estándar TEP como del músculo, se observa claramente un pico de intensa absorbancia a 538 nm, el cual coincide con el reportado en el método original (podrían darse variaciones de esta longitud de onda en base al espectrofotómetro usado), por lo que se siguió usando esta longitud de onda para las demás investigaciones. Además, es de notarse la nula presencia de coloraciones ajenas en base a la ausencia de otros picos de absorción.

Los espectros son presentados y comparados en las figuras 3a y 3b. Cabe señalar la gran similitud entre ambos espectros, lo que nos muestra la gran afinidad que existe en la destilación del estándar TEP y las SRATB.

b) COMPORTAMIENTO Y CUANTIFICACION DE LAS SRATB DESTILADAS.

De los espectros obtenidos, presentados en la figura 3c, se observa claramente que las SRATB, a partir de la sexta fracción (es decir, más de 50 ml. de destilado) presentan un segundo pico de absorción a 500 nm, con la consiguiente disminución del pico a 538 nm, siendo estos compuestos no identificados completamente pero ya - - previamente reportados (17).

La tabla No. 1 nos muestra la cuantificación de las SRATB en las mismas 6 fracciones, tomando como base una absorción máxima a la longitud de onda de 538 nm. Esta, basada en la suposición de que la destilación de -- SRATB es casi completa en un volumen de 60 ml. de destilado, señala que a un volumen de 50 ml. de destilado (en base al método modificado) se obtiene una recolección de SRATB de alrededor del 97% del total destilado de la - - muestra.

Por estos resultados se usó un volumen de destilado de 50 ml., el cual coincide con el recomendado por el método original.

T A B L A N o . 1

ANALISIS DE LAS SRATB SEPARADAS EN FRACCIONES DE 10 ml
POR EL METODO DE DESTILACION

FRACCION DE SRATB EN EL DESTILADO.	% DE SRATB EN EL DESTILADO			
	<u>SRATB DE PESCADO</u>		<u>DEL ESTANDAR TEP</u>	
	FRACCION INVESTIGADA	FRACCION ACUMULADA	FRACCION INVEST.	FRACCION ACUM.
FRACCION I	29.8	29.8	29.6	29.6
FRACCION II	24.2	54.0	24.0	53.6
FRACCION III	19.1	73.1	19.5	73.1
FRACCION IV	14.5	87.6	14.2	87.3
FRACCION V	9.4	97.0	9.7	97.0
FRACCION VI	2.6	99.6	2.3	99.3

c) PRUEBAS DE RECUPERACION.

Los resultados de este experimento (tabla No. 2), la cual no por ser simple deja de ser una de las más importantes de esta investigación, nos muestran una recuperación casi total del TEP añadido, con un error no mayor del 5%, por lo cual se puede afirmar que la modificación hecha al aparato de destilación, nos permite una separación de TEP y de SRATB de no menos del 95%, superando ampliamente los resultados anteriormente reportados y a la vez coloca a este método modificado en vías de ser un índice objetivo de la calidad.

T A B L A N o . 2

RECUPERACION DEL ESTANDAR TEP ANADIDO A DOS MUESTRAS DE
FILETES DE PESCADO USANDO EL METODO RECOMENDADO

MUESTRA DE PESCADO	TEP ANADIDO (μ MOLES)	VALOR SRATB (μ MOLES/Kg)	RECUPERACION TEP (%)
FILETE DE MACARELA	0.00	2.8	---
	0.80	10.4	95
	1.50	18.5	104
FILETE DE ARENQUE	0.00	10.6	---
	1.00	21.0	102
	3.00	38.6	95

d) INVESTIGACION DE SUBSTANCIAS INTERFECTORAS.

La determinación de los valores de SRATB de muestra a la cual habían sido adicionados diferentes compuestos, tales como lípidos, azúcares, compuestos sulfurados, antioxidantes, metales de transición, cloruro de sodio, hemoglobina, ácido láctico y bases nitrogenadas, mostraron una muy ligera o nula diferencia del control usado, con una desviación relativa máxima del 7.3%. Este resultado tiene varios significados, siendo el más importante el que nos señala que la liberación o separación de las SRATB no es impedida o afectada seriamente por compuestos usualmente señalados para ello (caso típico del cloruro de sodio y metales de transición), debido principalmente a la magnífica separación y destilación de las SRATB así como por la acción de los agentes antioxidantes y quelantes usados en la modificación. La variación individual por cada compuesto sobre el valor de las SRATB es presentado en la tabla No. 3.

El resultado de la investigación sobre la posible interferencia de productos de oxidación diferentes a las SRATB se muestra en la figura 4.

En estos espectros se observan dos picos principales de máxima absorción, a 500 y a 450 nm, que tal vez

podieran ser importantes para ciertos estudios cinéticos (17, 26) pero no útiles para el presente asesoramiento de la calidad en pescado, ya que no muestran una influencia de consideración en la cuantificación de las SRA7B.

T A B L A No. 3

INTERFERENCIAS DE VARIOS BIOCOMPUESTOS DEL MUSCULO DE
PESCADO EN LA DETERMINACION RECOMENDADA DE SRATB.

COMPUESTO	CANTIDAD AÑADIDA (MG)	% DE VARIACION
SORBITOL	4.9	+ 1.6
SACAROSA	50.8	- 1.6
ACIDO LACTICO	56.8	- 2.6
TBHQ	5.0	+ 3.1
TBHA	4.7	+ 1.4
MnSO ₄	5.4	+ 1.0
CuSO ₄	48.3	+ 6.3
NaCl	50.4	- 2.1
FeSO ₄	1.0	+ 2.1
HEMOGLOBINA	4.8	+ 2.1

T A B L A N o. 3

(CONTINUACION)

INTERFERENCIAS DE VARIOS BIOCOMPUESTOS DEL MUSCULO DE
PESCADO EN LA DETERMINACION RECOMENDADA DE SRATB.

COMPUESTO	CANTIDAD ANADIDA (MG)	% DE VARIACION
ACIDO PALMITICO	5.1	- 2.6
ACIDO ESTEARICO	4.8	+ 7.3
LECITINA	52.0	+ 2.6
CISTINA	52.3	+ 3.6
CISTEINA	5.4	+ 6.2
TIOUREA	5.2	+ 0.5
OTMA	47.1	- 3.6
TMA	5.2	- 7.3
DMA	5.1	- 4.7

e) APLICACION DEL METODO EN LA EVALUACION DE LA CALIDAD EN PESCADO.

Por medio del método propuesto, se determinaron los valores de las SRATB y la desviación estándar relativa de varias clases de pescado (filetes frescos y congelados). Los resultados, expuestos en la tabla No. 4, indican que - este método es objetivo y puede ser satisfactoriamente - - aplicado para la evaluación del desarrollo de rancidez en pescado bajo varias condiciones, mostrando que los valores de SRATB obtenidos, exhiben magnífica reproducibilidad y - sensibilidad con un error total de cerca del 7% para mues- tras de 10 g de carne.

Los cambios en el valor de las SRATB de pesca-- dos mantenidos a -2, -15 y -30°C, mostraron buena repro- - ducibilidad (figura 5), por lo cual se considera que el -- valor de SRATB puede ser empleado satisfactoriamente como un indicador de calidad para la evaluación de pescado al- macenado en términos del desarrollo de rancidez.

T A B L A N o . 4

VALORES DE SRATB EN VARIOS FILETES DE PESCADO (FRESCOS Y CONGELADOS), DETERMINADOS POR EL METODO DE DESTILACION.

MUESTRA	VALORES DE SRATB (μ MOLES/KG)	D.E.R. * (%)
<u>FILETES CONGELADOS</u>		
MACARELA	25.4	1.0
ARENQUE	11.3	5.0
ATUN	28.6	4.1
BACALAO	8.9	5.2
REDFISH	12.6	4.2
<u>FILETES FRESCOS</u>		
BACALAO	2.4	5.0
MACARELA	14.2	6.8
REDFISH	6.5	4.5

* DESVIACIONES ESTANDAR RELATIVAS CALCULADAS DE CUANDO MENOS 9 DETERMINACIONES.

V.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

De los resultados analizados anteriormente, se comprobó que la modificación hecha al aparato de destilación, nos permite la separación casi total de las SRATB, lo cual coloca a este método en una escala superior con respecto a los otros métodos usados con anterioridad que reportaban una recuperación de SRATB no mayor del 65 %.

Esto implica, aunado a su alta reproducibilidad, una seguridad casi total en los valores obtenidos de las SRATB y así poder relacionarlos con certeza y confiabilidad a pruebas degustadoras o a otros métodos químicos.

En relación a esto último, ha sido bien establecido que el incremento del valor de peróxido, así como el contenido de ácidos grasos libres, en pescado fresco y congelado, muestran analogía con los valores de las SRATB (5, 10, 16). Pero, estas correlaciones pueden variar con la temperatura y otras condiciones para el desarrollo de rancidez en el músculo de pescado (17, 30).

Aunque los cambios en el valor de las SRATB -- exhiben una buena relación lineal con resultados de pruebas panel organolépticas (1, 12, 15, 29), la correlación de valores de SRATB con datos de pruebas sensoriales para arenque, "redfish", macarela, bacalao y atún, fue reinves

tigada y la guía recomendada para el asesoramiento en el desarrollo de rancidez en pescado fresco o congelado es -- presentada en la tabla No. 5. Esto es, para una evaluación objetiva de la calidad, valores de SRATB menores que 8 umoles por Kg de pescado, podría ser clasificado como de excelente calidad, mientras que con valores de SRATB entre 9 y 20 umoles es únicamente bueno o aceptable. La carne de pescado con valores más altos sería considerada inaceptable.

Estos estándares de calidad en rancidez podrían requerir cierto ajuste para atún, ya que la formación en él de las SRATB es bastante rápida. Asimismo, los valores de SRATB no deben ser usadas como un único parámetro para la evaluación de la calidad en el pescado y se sugiere -- fuertemente el uso de algún otro índice de calidad, tales como ácidos grasos libres, valor de peróxido, etc., de -- forma que se tenga un asesoramiento de calidad digno de -- confianza para muestras de pescado. El método modificado se describe en detalle en el apéndice.

Como conclusión final, el método descrito para la evaluación y determinación de SRATB es una herramienta de alto valor para la determinación de rancidez, así como para la obtención de una guía general de calidad para --

pescado ya sea fresco o congelado, además de que queda --
abierta la posibilidad de su aplicación para otro tipo de
alimentos que presenten problemas de rancidez.

T A B L A N o . 5

GUIA RECOMENDADA EN LA DICTAMINACION DE GRADOS DE CALIDAD
POR RANCIDEZ PARA PESCADOS FRESCOS Y CONGELADOS USANDO --
VALORES DE SRATB

GRADO DE RANCIDEZ	VALORES DE SRATB (μ MOLES/KG DE PES.)	CALIDAD GENERAL
NO RANCIDO	0 - 8	EXCELENTE
LIGERAMENTE RANCIO	9 - 20	BUENO O ACEPTABLE
MODERADAMENTE RANCIO	MAS DE 21	INACEPTABLE

(1) PARA LA EVALUACION OBJETIVA DE LA CALIDAD, LAS SRATB DEBEN SER USADAS CON AL MENOS OTRO PARAMETRO DE CALIDAD ADICIONAL.

(2) VALORES MAS ALTOS DE SRATB PUEDEN SER NECESITADOS PARA LA EVALUACION DE ATUN.

VI.- APENDICES

APENDICE 1

FIGURAS

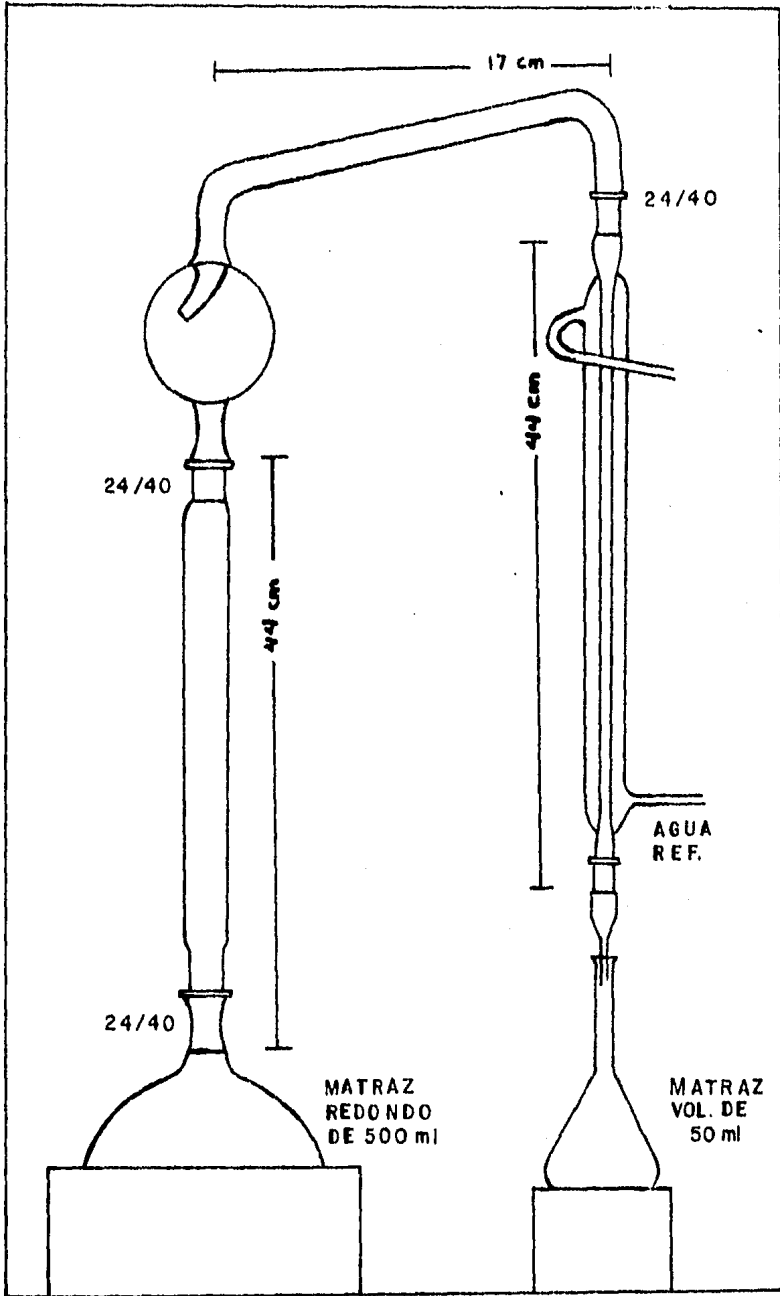


FIGURA 1a. APARATO DE DESTILACION.

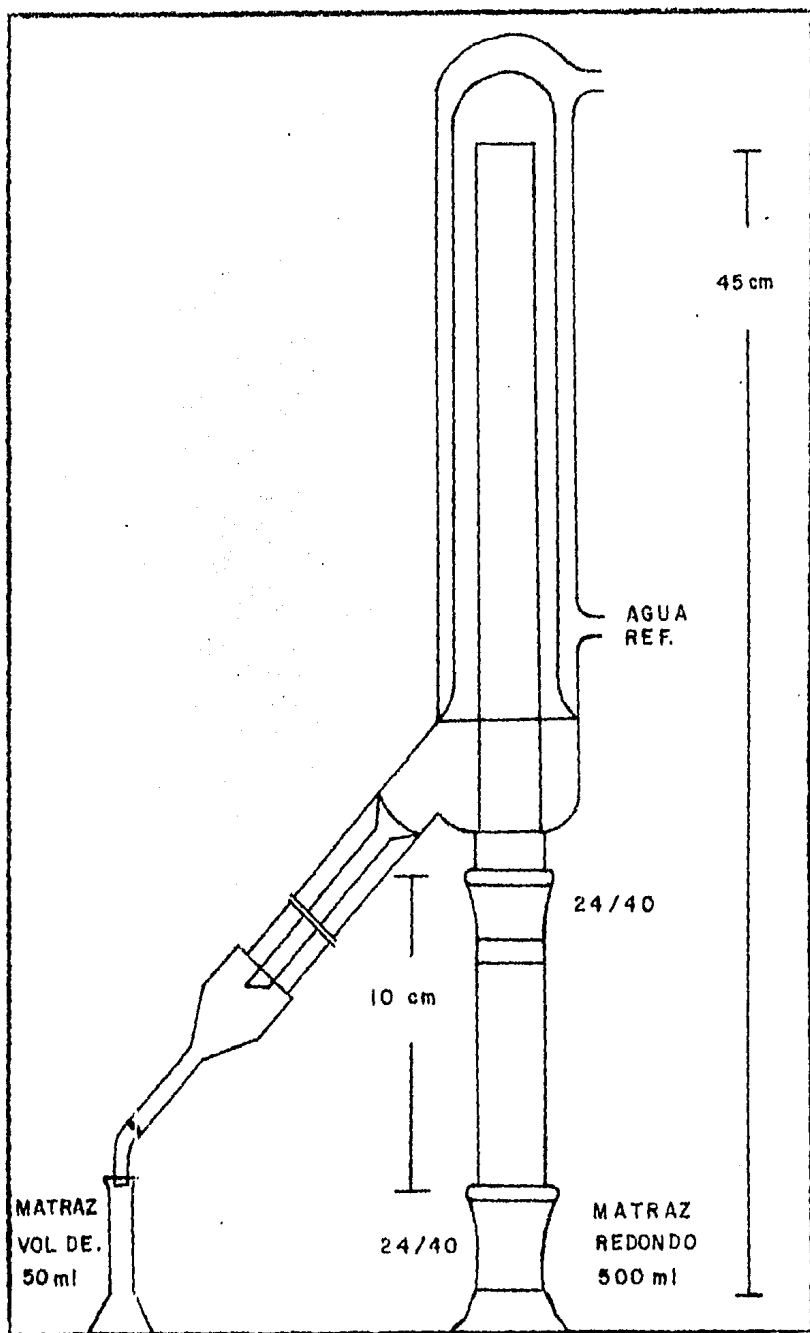


FIGURA 1B. APARATO DE DESTILACION CON CONDENSADOR Y CONCENTRADOR INTEGRADO

CURVA ESTANDAR DE SRATBA 538 nm.

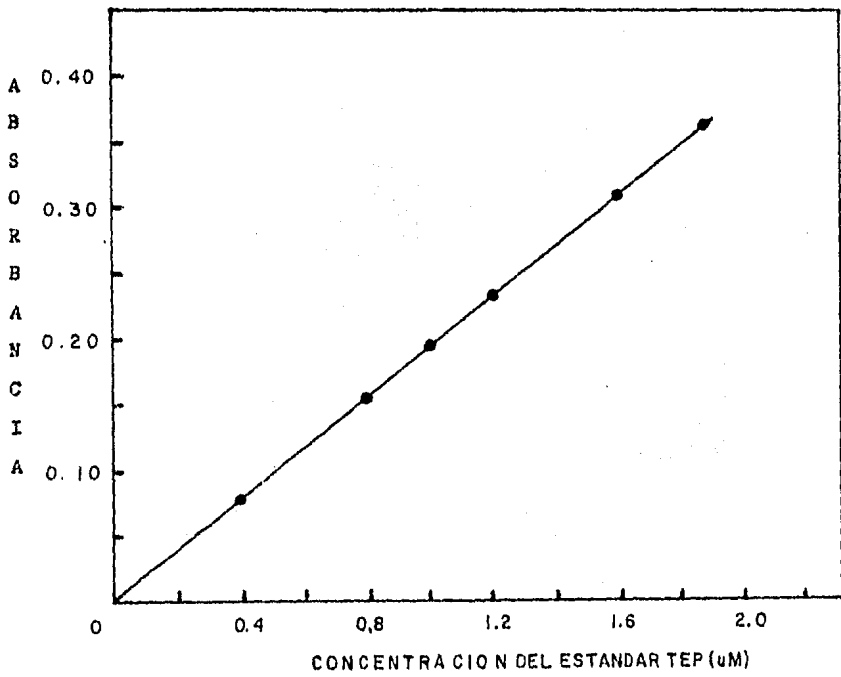


FIGURA 2

FIGURA 3

A B S O R B A N C I A

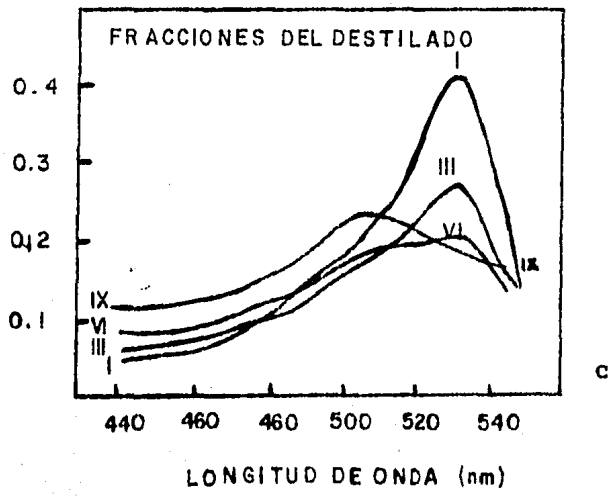
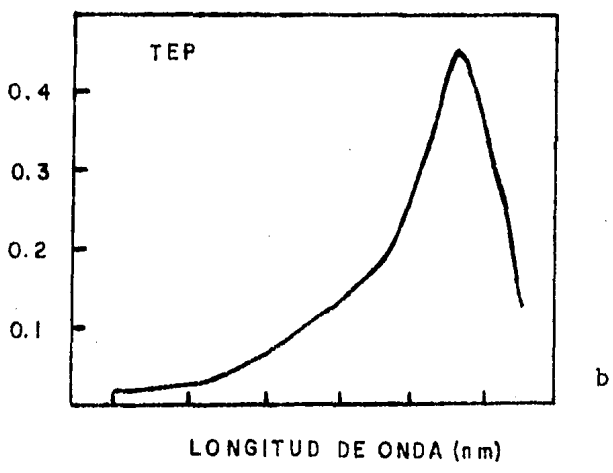
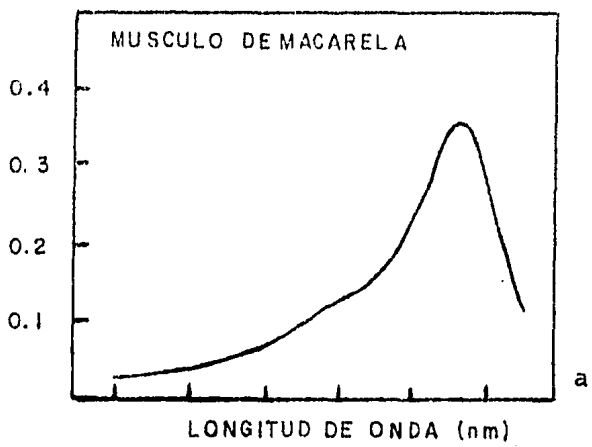
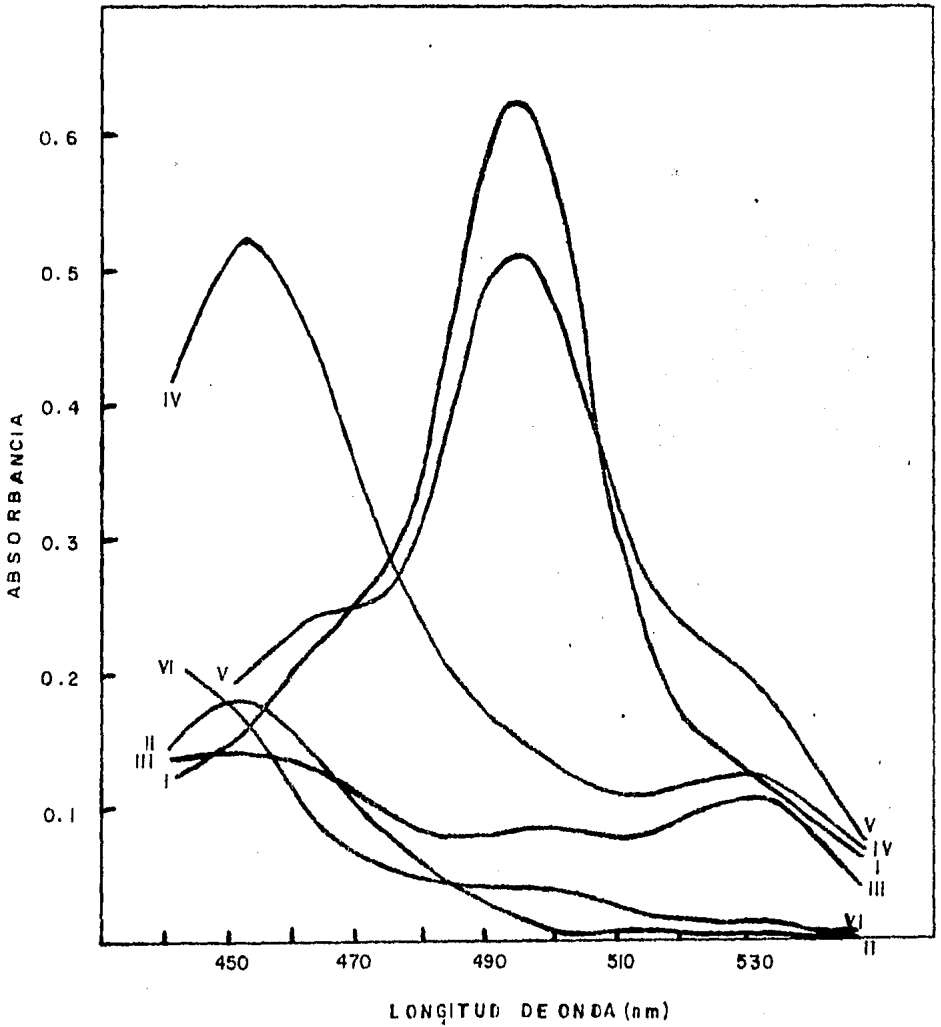


FIGURA 4



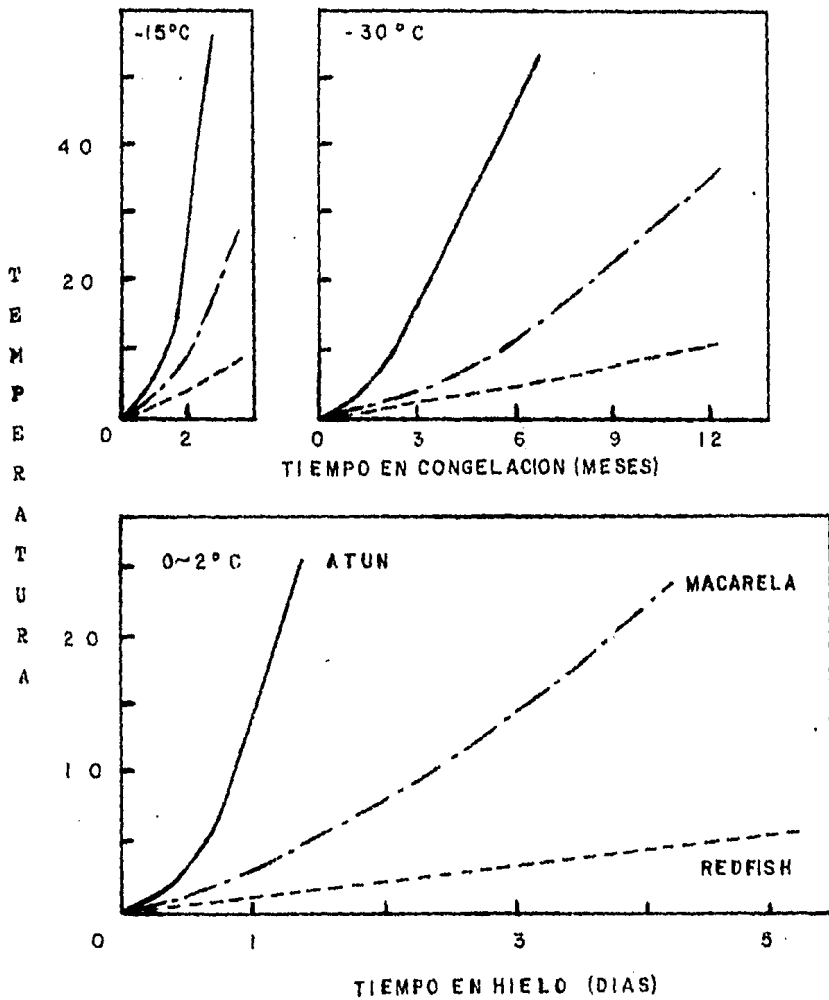


FIGURA 5

APENDICE 2

PROCEDIMIENTO RECOMENDADO

Se recomienda que la técnica de trabajo descrita a continuación, sea seguida al pie de la letra para de esta forma mantener al mínimo las variaciones en los valores de SRATB que podrían lograrse debido a oxidaciones en la manipulación de las muestras, fugas en la destilación, coloraciones ajenas, etc.

a) Preparación de reactivos

Acido glacial acético, ácido clorhídrico 4N, - ácido 2-tiobarbitúrico, propil galato, sal disódica de -- EDTA, gránulos de ebullición (BDH), 1, 1, 3, 3-tetraeto-- xipropano (TEP, PM 220, laboratorios K & K), son recomendados para ser usados en esta prueba. Los demás reacti-- vos usados en pruebas de interferencia fueron grado ACS.

a.i) Solución de ATB

Añada 1.44 g de ATB y 50 ml de agua destilada a un matraz volumétrico de 500 ml usando vigorosa agitación (agitador magnético). Añada entonces ácido acético glacial hasta llenar dos terceras partes del matraz. Agite vigorosamente por 10 minutos o hasta que el ATB esté - casi completamente disuelto. Llene el matraz hasta la -- marca con ácido acético glacial y disuelva el resto.

a.i.i) Solución estándar de TEP

Pese con exactitud 0.22 g de 1, 1, 3, 3-tetraetoxipropano (TEP) en un matraz volumétrico de 100 ml y diluya al volumen con agua destilada. Pipetee 10 ml de esta solución a un matraz volumétrico de 1000 ml y diluya al volumen con agua destilada para de esta forma obtener una solución 1×10^{-4} M, la cual puede almacenarse bajo refrigeración. La solución de trabajo (1×10^{-5} M) es preparada diluyendo 10 ml de la solución 10^{-4} M a 100 ml.

b) Preparación de la curva estándar

Pipetee cuidadosamente alícuotas de 0.4, 0.8, 1.2, 1.6 y 2.0 ml de la solución de trabajo de TEP en tubos de ensaye con tapón de rosca, añadiendo agua destilada hasta lograr un volumen total de 5 ml. Inmediatamente son añadidos 5 ml de la solución de ATB y los tubos son fuertemente tapados. Después de agitar moderadamente, caliente los tubos por 45 minutos en un baño de agua en vigorosa ebullición y enfríelos posteriormente en el chorro de agua. Determine la absorbancia de las soluciones a 538 nm en no más de media hora después del enfriamiento. El blanco (0.0 ml de TEP) es ajustado a cero.

Una gráfica de absorbancia contra concentración

de TEP nos da la curva estándar (figura 2) de la cual concentraciones subsecuentes de TEP pueden ser determinadas. Las concentraciones finales de TEP en los volúmenes de 10 ml anteriores corresponden a 4.0, 8.0, 12.0, 16.0 y 20.0 ($\times 10^{-7}$) moles por litro respectivamente.

c) Destilación de las SRATB

c.i) Transfiera porciones de 10 g al homogenizador (sin descongelarlas) añadiendo 35 ml de agua destilada y homogenice por dos minutos o hasta que la muestra quede finamente dividida.

Durante la homogenización, al matraz redondo de 500 ml añada unos cuantos gránulos de ebullición y 100 mg (aproximadamente) de propil galato y EDTA.

Transfiera la muestra homogenizada al matraz redondo adicionando agua destilada de modo que el peso total de la muestra y agua sume 105 g. Deje fluir libremente Nitrógeno en la muestra y entonces añada 95 ml de HCl 4N, conectándolo inmediatamente al aparato de destilación, colectando 50 ml de destilado en el matraz volumétrico. La destilación de las SRATB debe ser realizada en un periodo de 35 minutos o menos.

c.i.i) Determinación espectrofotométrica

Pipetee 5 ml de cada destilado y 5 ml de la solución de ATB en los tubos de ensaye, ciérrelos fuertemente, mézclelos y trátelos como se describió en la sección - curva estándar. Un blanco con 5 ml de agua destilada y 5 ml de solución de ATB debe ser realizado simultáneamente. Soluciones de muestras con absorbancias más altas que - - 0.500 deben ser diluidas con agua destilada o repetir el - análisis usando un menor volumen de destilado.

c.i.i.i) Cálculo del valor de las SRATB

El valor de las SRATB es expresado como umoles de malonaldehído por Kg de pescado. Partiendo de que es usada una alícuota de 5 ml de destilado a partir de 10 g de pescado, el valor de las SRATB puede ser calculado de la fórmula:

$$c \times 10^7 = \text{SRATB (umoles/Kg de pescado)} \quad (1)$$

donde c representa la concentración equivalente en moles por litro de TEP determinado de la curva estándar. Para alícuotas diferentes de 5 ml, la fórmula se transforma a:

$$\frac{5 \text{ (ml)}}{\text{tamaño de la alícuota (ml)}} \times c \times 10^7 = \text{SRATB} \quad (2)$$

Ejemplo:

En una prueba, los siguientes datos fueron obtenidos:

Curva estándar

Vol. TEP usado (10^{-5} M)	Conc. final en cubeta	Absorbancia a 538 nm
0.0 ml	0	0.000
0.4 "	0.4×10^{-6} M	0.077
0.8 "	0.8 "	0.154
1.0 "	1.0 "	0.193
1.2 "	1.2 "	0.232
1.6 "	1.6 "	0.309
2.0 "	2.0 "	0.386

Muestra (macarela 10 g)

Destilado usado	Absorbancia
3 ml	0.195
5 ml	0.325

Cálculos

De la gráfica, una absorbancia de 0.325 corresponde a una concentración equivalente de TEP de 1.68×10^{-6} M. Usando la fórmula (1), la concentración de SRATB es --

$$1.68 \times 10^{-6} \times 10^7 = 16.8 \text{ umoles/Kg de pescado.}$$

Similarmente, la absorbancia de la alícuota de 3 ml es usada en la fórmula (2);

$$5/3 \times 1.01 \times 10^{-5} \times 10^7 = 16.8 \text{ umoles/Kg}$$

La concentración c puede ser también calculada a partir de la ley de Beer:

$$A = \epsilon b c$$

donde A = absorbancia

ϵ = coeficiente de extinción (pendiente de la línea en la curva estándar)

b = longitud de paso de luz en la cubeta (usualmente 1 cm)

c = concentración molar de TEP en cubeta.

Ejemplo:

Para una absorbancia de 0.325 usando 1.93×10^5 como la pendiente de la línea, la concentración es derivada como:

$$c = A/\epsilon b;$$

$$c = 0.325/1.93 \times 10^5 \times 1$$

$$c = 1.68 \times 10^{-6} \text{ M}$$

VII.- BIBLIOGRAFIA

1. Anderson, K. and C. E. Danielson. Storage changes in frozen fish: A comparison of objective and subjective tests. Food Techno., 15, 55-56 (1961).
2. Asakawa, T., Nomura, Y., and S. Matsushita. On the reacting compounds in the TBA method for the determination of lipid oxidation. Research Institute for Food Science, Kyoto University (Uji). (1975).
3. Bernheim, F., Bernheim, M. L. C., and K. M. Wilbur. The reaction between thiobarbituric acid and the oxidation products of certain lipids. J. Biol. Chem., 174, 257-264 (1948).
4. Bishop, D. M. A critical examination of a TBA procedure for the measurement of malonaldehyde in fishery products. Fisheries Research Board of Canada. Halifax Laboratory. Halifax, Nova Scotia (1968).
5. Botta, J. R., and J. F. Richards. Thiobarbituric acid value, total long-chain free fatty acids, and flavour of pacific halibut (Hippoglossus stenolepis) and chinook salmon (Oncarhynchus tshawytscha) frozen at sea. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 30, 63-69 (1973).
6. Castell, C. H. and D. M. Bishop. Effect of hematin com-

- pounds on the development of rancidity in muscle of cod, flounder, scallops and lobster. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 26, 2299-2309 (1969).
7. Castell, C. H., Moore, B., and W. Neal. Cause and control of spurious thiobarbituric acid values from fish muscle in the presence of inorganic iron salts. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 23, 737-746 (1966).
 8. Dahle, L. K., Hill, E. G. and R. T. Holman. The thiobarbituric acid reaction and the autoxidations of polyunsaturated fatty acid methyl esters. Archives of Biochemistry and Biophysics, 98, 253-261 (1962).
 9. Deng, J. C. Effect of iced storage on free fatty acid production and lipid oxidation in mullet muscle. J. Food Sci., 43, 337-340 (1978).
 10. Dyer, W. J. and D. I. Fraser. Proteins in fish muscle. 13. Lipid hydrolysis. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 16, 43-52 (1959).
 11. Frankel, E. N. Lipid oxidation. Prog. Lipid Res., 19, 1-22 (1980).
 12. Greene, B. E. and T. H. Cumuze. Relationship between

- TBA numbers and inexperienced panelist's assessments of oxidized flavour in cooked beef. *J. Food Sci.*, 47, 52-58 (1981).
13. Ho, S. Y. and W. D. Brown. Reactivities of lipid solvents with thiobarbituric acid. *J. Food Sci.*, 31, 386-388 (1966).
 14. Ke, P. J., Ackman, R. G. and B. A. Linke. Autoxidation of polyunsaturated fatty compounds in mackerel oil: formation of 2,4,7-decatrienals. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 52, 349-353 (1975).
 15. Ke, P. J., Ackman, R. G. and D. M. Nash. Proposed rancidity indexes for assessing the storage life of frozen mackerel. Fisheries and Oceans Canada, Halifax Laboratory, New Series Circular No. 52 (1975).
 16. Ke, P. J., Ackman, R. G., Linke, B. A. and D. M. Nash. Differential lipid oxidation in various parts of frozen mackerel. *J. Food Technol.*, 12, 37-47 (1977).
 17. Ke, P. J., and A. D. Woyewoda. Microdetermination of thiobarbituric acid value in marine lipids by a direct spectrophotometric method with a monophasic reaction system. *Anal. Chim. Acta*, 106, 279-284 (1979).

18. Ke, P. J., Nash, D. M. and R. G. Ackman. Quality preservation in frozen mackerel. *Can. J. Food Sci. Technol.*, 9, 135-138 (1976).
19. Kohn, H. I. and N. Liversedge. On a new aerobic metabolite whose production by brain is inhibited by apomorphine, emetine, ergotamine, epinephrine and menadione. *J. Pharmacol.*, 82, 292-295 (1944).
20. Kwon, T. W. and H. S. Olcott. Thiobarbituric-acid reactive substances from autoxidized or ultraviolet irradiated unsaturated fatty esters and squalene. Institute of Marine Resources, University of California (1967).
21. Kwon, T. W. and B. M. Watts. Determination of malonaldehyde by ultraviolet spectrophotometry. *J. Food Research*, 28, 627-630 (1963).
22. Kwon, T. W., Menzel, D. B. and H. S. Olcott. Reactivity of malonaldehyde with food constituents. *J. Food Sci.*, 30, 808-813 (1965).
23. Kwon, T. W. and H. S. Olcott. Malonaldehyde from the autoxidation of methyl linolenate. *Nature*, 210, 214-215 (1966).

24. Lemon, D. W. An improved TBA test for rancidity. Fisheries and Oceans Canada, Halifax Laboratory, New Series Circular No. 51 (1975).
25. Maclean, J. and C. H. Castell. Rancidity in lean fish muscle. I. A proposed accelerated cooper-catalyzed method for evaluating the tendency of fish muscle to become rancid. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 21, 1345--1359 (1964).
26. Marcuse, R. and L. Johansson. Studies on the TBA test for rancidity grading: II. TBA reactivity of different aldehyde classes. J. Amer. Oil Chem. Soc., 50, 387-391 (1973).
27. Munkner, W. Application of the 2-thiobarbituric acid reaction (TBA reaction) in fish technology. Translation series No. 943. Fisheries and Oceans Canada (1967).
28. Placer, Z. A., Cushman, L. L. and B. C. Johnson. Estimation of product lipid peroxidation (malonyldialdehyde) in biochemical systems. Anal. Biochem., 16, 359-364 (1966).
29. Ryan, B. A. and M. E. Stansby. Measurement of rancidity in fishery products by 2-thiobarbituric acid method.

Commercial Fisheries Review, 21, 21-23 (1959).

30. Saslaw, L. D. and V. S. Waravdekar. Behavior of unsaturated fatty acids in the thiobarbituric acid test after radiolysis. Radiation Research, 24, 375-389 (1965).
31. Saslaw, L. D., Corwin, L. M. and V. S. Waravdekar. Production of chromophoric substances in the thiobarbituric acid test. Arch. Biochem. and Biophys. 114, 61-66 (1966).
32. Schoenmakers, A. W. and B. G. Tarladgis. Reliability of the thiobarbituric acid test in the presence of inorganic iron. Nature, 504, 1153 (1966).
33. Shibata, N. and T. Kinumaki. An improvement of TBA procedure as the measure of the oxidative deterioration occurring in fish oils. I. Distillation procedure. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 45, 499-503 (1979).
34. Shibata, N. and T. Kinumaki. An improvement of TBA procedure as the measure of the oxidative deterioration occurring in fish oils. II. Intact sample procedure. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 45, 505-509 (1979).
35. Sinnhuber, R. O. and T. C. Yu. 2-thiobarbituric acid method for the measurement of rancidity in fishery products. II. The quantitative determination of malonal-

dehyde. Food Technol., 12, 9-12 (1958).

36. Sinnhuber, R. O. and T. C. Yu. Characterization of the red pigment formed in the 2-thiobarbituric acid determination of oxidative rancidity. Food Research, 23, - 626-634 (1958).
37. Tarladgis, B. G., Watts, B. M. and M. T. Younathan. A distillation method for the quantitative determination of malonaldehyde in rancid foods. J. Amer. Oil Chem. Soc., 37, 44-48 (1960).
38. Tarladgis, B. G., Pearson, A. M. and L. R. Dugan Jr. The chemistry of the 2-thiobarbituric acid test for the determination of oxidative rancidity in foods. I. Some important side reactions. J. Amer. Oil Chem. Soc., 39, 34-39 (1962).
39. Tarladgis, B. G., Pearson, A. M. and L. R. Dugan Jr, Chemistry of the 2-thiobarbituric acid test for determination of oxidative rancidity in foods. II. Formation of the TBA-malonaldehyde complex without acid-heat treatment, J. Sci. Food Agric., 15, 602-607 (1964).
40. Vyncke, W. Direct determination of the thiobarbituric acid value in trichloroacetic acid extracts of fish as

a measure of oxidative rancidity. *Fette Seifen Austrich mittel*, 72, 1084-1087 (1970).

41. Witte, V. C., Krause, G. F. and M. E. Bailey. A new extraction method for determining 2-thiobarbituric acid values of pork and beef during storage. *J. Food Sci.*, 35, 582-585 (1970).
42. Yu, T. C. and R. O. Sinnhuber. Further observations on the 2-thiobarbituric acid method for measurement of oxidative rancidity. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 41, 540-543 (1964).
43. Yu, T. C. and R. O. Sinnhuber. 2-thiobarbituric acid method for the measurement of rancidity in fishery products. *Food Technol.*, 11, 104-108 (1957).