

00567

2
241



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

**DETERIORO QUIMICO DE LIPIDOS EN
CARNE DE CERDO Y POLLO EN
CONGELACION**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIA DE ALIMENTOS (QUIMICA
DE ALIMENTOS).**

PRESENTA:

PRISCILA/BALAREZO MANZANO.

ASESOR: M. EN C. FRANCISCA ITURBE CHINAS.

MEXICO, D. F. 1998.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

264581



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 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.

PAGINACIÓN

DISCONTINUA

**DETERIORO QUIMICO DE LIPIDOS EN CARNE DE
CERDO Y POLLO EN CONGELACION**

tesis que para obtener el grado de:maestría en ciencia de
alimentos (química de alimentos) presenta
PRISCILA BALAREZO MANZANO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA
POSGRADO EN CIENCIA DE ALIMENTOS
méxico, 1998.

director de tesis: M.en C. Francisca Iturbe Ch.

jurado: M. en C. Angela Sotelo López

Dra. Isabel Guerrero L.

Dr. Hermilo Leal Lara

M. en C. Angeles Valdivia López

M. en C. Mariano Garcia Garibay

México, D.F. Agosto 1998

a mis padres.....

Mi agradecimiento a todas las personas
que aportaron su valiosa colaboración
para la elaboración de esta tesis.

A mi asesora por sus enseñanzas y ayuda,

A Julieta y Sandrita, sin ellas mi
trabajo no sería el mismo.

A todos mis amigos y amigas mexicanas,
que me han hecho sentir como en mi
propia casa.

A Freddy por ser como es, mil gracias.

INDICE

	Pag.
RESUMEN	I
INTRODUCCION	II
OBJETIVOS	IV
1. GENERALIDADES	1
1.1. Carnes: composición	1
1.2. Almacenamiento y congelación de carnes	5
1.3. Autooxidación de los lípidos	6
1.3.1. Mecanismo de las reacciones de autooxidación	8
1.3.2. Formación de hidroperóxidos	10
1.3.3. Oxidación con oxígeno singulete	12
1.3.4. Descomposición de hidroperóxidos	12
1.3.5. Descomposición de aldehídos formados	13
1.3.6. Otras reacciones de los radicales alquil y alcoxi	14
1.4. Principales factores que inducen la autooxidación	16
1.4.1. Actividad de agua	16
1.4.2. Composición de la grasa	18
1.4.3. Temperatura	19
1.4.4. Oxígeno	19
1.4.5. Manipulación y tipo de muestra	19
1.4.6. Papel de los antioxidantes en la inhibición de formación de peróxidos	20
1.5. Consecuencia de la oxidación de los lípidos en los alimentos	21
a.- Daño de proteínas	21
b.- Olores y sabores desagradables	23
c.- Cambio de textura y de color	23
d.- Pérdida de vitaminas	24
1.6. Implicaciones de la oxidación de los lípidos en la dieta	24
1.7. Caracterización de los productos de oxidación	25
1.7.1. Consumo de oxígeno	26
1.7.2. Determinación de ácidos grasos	26
1.7.3. Índice de hidroperóxidos	27
1.7.4. Análisis con ácido tiobarbitúrico	29
1.7.5. Índice de Kreis	30
1.7.6. Otras determinaciones	31
1.8. Extracción de grasa y productos de oxidación	33
1.8.1. Métodos de extracción directa con disolventes	33
1.8.2. Métodos de extracción por solubilización	35
1.8.3. Métodos volumétricos	36
1.8.4. Métodos físicos	36
1.8.5. Tipos de disolventes empleados	36
2. MATERIALES Y METODOS	38
2.1. 1era. Etapa: Validación de las metodologías	39
2.1.1. Extracción y cuantificación de lípidos	39
2.1.1.1. Método de Bligh y Dyer	39
2.1.2. Selección del disolvente	40

2.1.3.	Métodos de análisis de deterioro de lípidos	40
2.1.3.1	Índice de peróxidos	40
	a.-Método de la AOAC	40
	b.-Método colorimétrico	41
2.1.3.2	Índice de TBA	43
2.1.3.3	Índice de Kreis	44
2.2.	2da. Etapa: Monitoreo del deterioro oxidativo de lípidos en carne de cerdo (chuleta) y pollo congelados	45
2.2.1.	Preparación de las muestras	45
	a.-Carne de cerdo	45
	b.-Carne de pollo	46
2.2.2.	Extracción directa de lípidos y productos de oxidación con disolventes	46
2.2.2.1	Cuantificación de lípidos totales	46
2.2.2.2.	Cuantificación de los productos de oxidación de lípidos en las muestras en almacenamiento	46
2.2.3.	Análisis estadístico	47
3.	RESULTADOS: ANALISIS Y DISCUSION	48
3.1.	Validación de los métodos y selección de los disolventes	49
3.1.1.	Trabajo preliminar	49
3.1.1.1.	Selección del disolvente	51
3.1.1.2.	Optimización del proceso de extracción	53
3.1.1.3.	Determinación del efecto del disolvente usado para la medición de peróxidos en grasa de cerdo y pollo	53
3.2.	Almacenamiento y monitoreo de la oxidación de lípidos en carne de cerdo y pollo almacenadas en congelación a -18°C	55
3.2.1.	Muestra de carne de cerdo (chuleta)	56
3.2.2.	Carne de pollo	62
4.	CONCLUSIONES	68
	BIBLIOGRAFIA	70
	APENDICE	

RESUMEN

La carne es muy apreciada por sus características nutricionales y sensoriales, sin embargo debido a la oxidación de los lípidos se deteriora fácilmente, aun almacenada en congelación, siendo ésta la causa principal de la pérdida de calidad.

Se realizó el seguimiento de los productos generados durante la oxidación de los lípidos en carne de cerdo y pollo almacenadas en congelación, se extrajo la grasa mediante el método de Bligh y Dyer, usando la mezcla diclorometano-metanol. Se determinaron los Índices de Peróxidos, con sus variantes colorimétrica y volumétrica; Índice de TBA (Acido tiobarbitúrico) y el Índice de Kreis.

Durante el monitoreo, que duró cerca de un año a -18°C , se encontró que los valores de peróxidos para la carne de cerdo rebasan los límites permitidos a los 320 días, con un valor de 10.49 meq peróxido/kg grasa si se mide por el método volumétrico; mientras que por el método colorimétrico, rebasa este límite después de los 136 días. El Índice de TBA presentó un comportamiento variable dando el valor más alto al final de los monitoreos con 1.46 mg malonaldehído (MAD)/ kg muestra; finalmente el valor del Índice de Kreis es positivo a partir del día 77.

Para la muestra de pollo se rebasó el límite permitido de peróxidos después de los 215 días para el método colorimétrico, mientras que para el método volumétrico se obtuvo el valor más alto a los 258 días (7.82 meq peróxido/kg grasa), para después decaer. Para el Índice de TBA el mayor valor fue de 1.18 mg MAD/ kg muestra y en el Índice de Kreis fue positivo a partir del día 77.

Se concluye que se deben consumir estos productos antes del día 77 a partir del cual comienza a acelerarse su deterioro, además se debe emplear más de una técnica para cuantificar los productos de oxidación con el fin de abarcar las diferentes etapas del proceso de oxidación.

INTRODUCCION

Los alimentos de origen animal han sido desde tiempos remotos usados en gran escala por el hombre para satisfacer sus necesidades alimenticias. Dentro de éstos, las carnes han jugado un papel muy importante, es por esto que al pasar de los años se han utilizado diversos métodos para conservarla por períodos de tiempo más prolongados.

La congelación es una de las técnicas de conservación ampliamente usadas para mantener la calidad nutricional y sanitaria de las carnes; presenta una serie de ventajas, como evitar el deterioro microbiológico de los productos, disminuyendo la velocidad del crecimiento microbiano. Sin embargo, el deterioro químico, mediado por la oxidación no enzimática de los lípidos se favorece ya que, al congelarlos el agua se inmoviliza y se generan condiciones de baja actividad acuosa, en donde los lípidos se encuentran más expuestos a la acción del oxígeno atmosférico y a los compuestos catalizadores del proceso oxidativo.

La oxidación de los lípidos, conocida también como rancidez oxidativa, es especialmente importante en las carnes o productos a base de carne de pollo o alimentos marinos que contienen ácidos grasos altamente insaturados, ya que son mas susceptibles, llevando a la degradación y pérdida de calidad de estos productos.

Durante el proceso de oxidación se producen una serie de compuestos de bajo peso molecular como aldehídos, cetonas, hidrocarburos, etc, además de compuestos de alto peso molecular como polímeros complejos. Estos compuestos son muy variados y pueden reaccionar con otros componentes de la carne, modificando algunas características sensoriales como la textura, o produciendo olores y sabores desagradables. Conociendo que en el deterioro químico de los

lípidos se ven afectadas características de la calidad de la carne así como su valor nutritivo y seguridad, es necesario realizar la evaluación de la calidad integral de la carne y sus productos congelados.

Por otro lado, la mayoría de las pruebas que se emplean para determinar el grado de deterioro de los lípidos requieren que la grasa esté separada del resto de la matriz alimenticia, si a la diversidad en los productos de oxidación se añade que la composición lipídica varía de un alimento a otro, su solubilidad en los disolventes también variará. Por esta razón, se requiere de la selección adecuada del disolvente o sistema de disolventes, que extraigan el total de lípidos contenidos en la muestra así como los productos de oxidación, para no subestimar el contenido de los mismos.

El conocer la evolución del proceso oxidativo en productos cárnicos, determinando los indicadores de este proceso mediante procedimientos validados, resulta necesario para asegurar que lleguen a los consumidores productos de óptima calidad. Dos productos se seleccionaron para este estudio la chuleta de cerdo y pollo completo, que son conservados frecuentemente en congelación por períodos prolongados.

OBJETIVOS

Objetivo General:

Conocer la evolución del proceso de oxidación en carne de cerdo y pollo almacenados en congelación, por medio de métodos válidos, para establecer parámetros de calidad confiables.

Objetivos Particulares:

- Encontrar el sistema de disolventes más adecuado para la extracción de los productos de oxidación en la grasa de la carne de cerdo y pollo.
- Seleccionar los métodos adecuados para medir la oxidación de las grasas de la carne de cerdo y pollo.
- Realizar el monitoreo en las muestras almacenadas en congelación a -18°C .
- Establecer la vida útil de la carne de cerdo y el pollo almacenados en congelación.

1.GENERALIDADES

1.1. CARNES: COMPOSICION

La importancia de la carne en la alimentación humana no sólo radica en su alto valor nutritivo, sino además en sus características sensoriales agradables; la textura, jugosidad, así como su comportamiento en los procesos de deterioro dependerá de la composición general de la carne. La composición del tejido muscular varía de una especie a otra; incluso, dentro de la misma especie, los músculos rojos contiene más lípidos que los músculos blancos.¹ La composición general de varias especies se puede observar en la tabla 1.

Tabla1. Composición de varias carnes magras.²

Especie	Composición (g/100 g de producto fresco)			
	Agua	Proteínas	Lípidos	Cenizas
Res	70-73	20-22	4.8	1
Cerdo	68-70	19-20	9-11	1.4
Pollo	73.7	20-23	4.7	1
Cordero	73	20	5-6	1.6
Bacalao	81.2	17.6	0.3	1.2
Salmón	64	20-22	13-15	1.3

La composición lipídica puede variar enormemente y se puede dividir básicamente en lípidos del tejido muscular y lípidos del tejido adiposo. Los lípidos de la porción magra contienen mayor cantidad de fosfolípidos que los lípidos de la porción adiposa. Los músculos magros contienen aproximadamente 0.5-1 % de fosfolípidos y los ácidos grasos de los fosfolípidos son más insaturados que los correspondientes a los triacilgliceroles.³

Carpenter y col.⁴ informan que existen diferencias en el contenido de grasa en el lomo de cerdo, estas variaciones van a depender del peso del animal. Se encontró que las canales de cerdo que tienen un peso promedio entre 297-369 kg (grupo liviano), el contenido de grasa es de 15.37 a 41.20%, mientras que para las canales con peso promedio entre 484-550 (grupo pesado), el contenido varía de 11.32 a 35.49%.

Además existe diferencia en el contenido de grasa en las diferentes vértebras del animal así como en el lomo derecho e izquierdo, variando de 17.97 a 29.01% para el grupo liviano y 22.35 a 33.32% en el grupo pesado.

Los cortes empleados en el cerdo difieren de los empleados para carne de res, ternera y cordero. Comenzando de la cabeza al final del canal los cortes principales incluyen: carilla o papada, el lomo que corresponde a la parte superior del hombro en el cordero y ternera o la parte de la res comprendida entre el cuello y la espaldilla. El lomo de cerdo comprende casi toda la columna vertebral y parte del hueso de la cadera, dentro de este encontramos la chuleta y la pierna a la cual corresponde el jamón.⁵

Para el caso del pollo, la mayor proporción de grasa se encuentra entre la piel y los músculos, principalmente en la zona baja del abdomen. El contenido de grasa intramuscular es muy bajo, de 1.14% en la pechuga y 5.99% en el muslo.⁶ Se comercializa generalmente completo, tanto en fresco como almacenado. Los cortes más usados son: cuarto delantero que se extiende desde la primera vértebra torácica hasta la sexta, esto comprende la pechuga; además encontramos otros cortes como la pierna entera, el muslo, etc. En algunas ocasiones el pollo es deshuesado mecánicamente y almacenado de esa manera.⁷

Las grasas animales contienen grandes cantidades de ácidos grasos C16 y C18, cantidades intermedias de ácidos insaturados, y pequeñas cantidades de ácidos grasos de cadena impar, el grado de saturación de los lípidos en diferentes especies se puede apreciar en la tabla 2.

Tabla 2. Grado de saturación de los ácidos grasos componentes de los lípidos del tejido muscular de diversas especies(g/100g de grasa).³

Especie	Saturados	Monoenoicos	Polienoicos
Vacuno	40-71	41-53	0-6
Cerdo	39-49	43-70	3-18
Carnero	46-64	36-47	3-5
Aves	28-33	39-51	14-23
Bacalao (Pescado magro)	30	22	48
Caballa (Pescado magro)	30	44	26

Los lípidos de la porción magra juegan un papel importante en el deterioro oxidativo o enranciamiento de las carnes, ya que los ácidos grasos insaturados son más susceptibles a sufrir este daño. En la tabla 3 se presentan datos que indican el tipo y proporción de ácidos grasos presentes en los tipos de carne objeto de este estudio.

Tabla 3. Composición de ácidos grasos en cerdo y pollo (g/g grasa)⁸

Componente	Pollo ^a	Cerdo		
		Subcutáneo ^b		Perirenal ^c
		Exterior	Interior	
Acidos grasos				
Laurico	-	trazas	trazas	trazas
Mirístico	0.1	1.3	0.1	4.0
Palmitico	25.6	28.3	30.1	28.0
Estearico	7.0	11.9	16.2	17.0
Araquidónico	-	trazas	trazas	trazas
Total saturados	32.7	41.5	47.3	49.0
Palmitoleico	7.0	2.7	2.7	2.0
Oleico	20.4	47.5	40.9	36.0
Linoleico	21.3	6.0	7.1	11.8
Linolénico	-	0.0	0.3	0.2
Araq.+ Quipandónico	0.6	2.1	1.7	1.0
Total Insaturados	67.3	58.5	52.7	51.0

^a Grasa asociada con la piel.

^b Grasa de las regiones dorsal, torácica y lumbar

^c Grasa alrededor de los riñones.

Además de las diferencias en composición de la grasa, otro factor importante es la proporción en la que se encuentran depositadas en el animal, ya que esto facilitará el acceso de oxígeno o contacto con los iones férricos que son factores que favorecen la oxidación.

Los iones de los metales de transición son buenos promotores de las reacciones en las que intervienen radicales libres, ya que el electrón no apareado puede ser fácilmente transferido. Estos metales aceleran la peroxidación por descomposición de los hidroperóxidos de los lípidos, por lo tanto el átomo de hierro promueve la autooxidación de las grasas.²

En las carnes el hierro, presente en las hemoproteínas, facilita la oxidación de los lípidos mediante la reacción hemoglobina-oxígeno que produce oxígeno singulete.⁹ Además el átomo de hierro estimula la peroxidación en las micelas con carga negativa que contienen hidroperóxidos lipídicos.^{2,10.}

Los pigmentos de la carne pueden actuar como potentes catalizadores, principalmente en la carne molida donde los lípidos están íntimamente mezclados, incrementado la velocidad del proceso de oxidación. En la carne que se encuentra en cortes grandes la velocidad del proceso es menor¹¹ Además se puede encontrar hierro en las lipoxigenasas, ciclooxigenasas, citocromo p.450, peroxidasas y mioglobina, que son considerados importantes catalizadores.¹²

El hierro contenido en la carne puede actuar de dos maneras: por el desplegamiento que pueden sufrir las proteínas de la carne durante su almacenamiento en congelación, porque se facilita la exposición del hierro para reaccionar con los peróxidos, o dentro de la proteína donde se encuentra libre para ser oxidado a la forma férrica.

1.2. ALMACENAMIENTO Y CONGELACION DE CARNES

Dentro de las numerosas técnicas de conservación una de las más empleadas actualmente es la congelación, su eficiencia radica en la reducción de la actividad de agua por la formación de cristales de hielo y en el descenso de temperatura. Aunque algunos microorganismos sobreviven a temperaturas muy bajas, generalmente no tienen la oportunidad para desarrollarse si se mantienen las temperaturas de almacenamiento recomendadas.³

Hoy en día se cuentan con numerosas técnicas para conservar por períodos de tiempo cada vez mas prolongados la carne y los productos cárnicos.

Para el congelamiento de las muestras debe tomarse en cuenta que si el enfriamiento es muy rápido o muy lento puede ser dañino para las células, por la formación de cristales de hielo intracelulares durante el enfriamiento, observándose también crecimiento por recristalización lo que lleva a la ruptura de las membranas intra y extracelulares.¹³ Esto trae como consecuencia la liberación de los compuestos intracelulares y la compresión de las fibras musculares.

El aumento de la concentración salina y el concomitante cambio del pH, por la disminución del agua "líquida", puede causar una extensa desnaturalización con el consiguiente descenso de la capacidad de retención de agua del tejido. Esta pérdida de la capacidad de retención de agua de las proteínas junto con la lesión mecánica de las células por los cristales de hielo es responsable en gran parte del exudado durante la descongelación.

En carnes y pescados almacenados por largos períodos en congelación, se produce deterioro en la textura, el sabor y el color; en especial cuando la congelación es deficiente; los cambios en la textura se dan 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 variadas principalmente por la oxidación de lípidos.¹⁴

Básicamente por su composición las proteínas y los lípidos del músculo de pescado son más sensibles a la desnaturalización y a la oxidación, respectivamente, que sus equivalentes del músculo de mamífero o aves.³

1.3. AUTOOXIDACION DE LOS LIPIDOS

Se define la autooxidación como la reacción del oxígeno molecular con cualquier sustancia orgánica,⁵ la autooxidación de los lípidos es la principal causa de deterioro en alimentos; tanto los alimentos de origen vegetal como los de origen animal tienen depósitos de almacenamiento de grasas que son fuentes potenciales de energía por betaoxidación o como lípidos de membrana. Los lípidos almacenados son en gran proporción triglicéridos, con una pequeña cantidad de otros lípidos como fosfolípidos, esteroides, esfingolípidos y glicolípidos.^{8,11} Los lípidos de origen animal contienen cantidades elevadas de ácidos grasos insaturados; la presencia de lípidos en un alimento, aun en baja proporción, hace que éste sea susceptible a la autooxidación, siendo un problema tan grande como el de los alimentos grasos. El proceso de oxidación confiere a las carnes olores y sabores desagradables dañando las características organolépticas de éstas, siendo productos inaceptables por el consumidor.

Las reacciones químicas que se producen durante el proceso de oxidación son sumamente complejas y pueden darse mediante mecanismos enzimáticos y no enzimáticos.

En presencia de calor y humedad, los enlaces éster en las grasas pueden sufrir una hidrólisis rápida para producir ácidos grasos, monoglicéridos, diglicéridos y

glicerol. Las enzimas lipolíticas también catalizan la liberación de ácidos grasos.⁸ La lipólisis es una de las principales reacciones que se producen durante la fritura de los alimentos, debido al gran contenido de agua del producto y a las temperaturas relativamente altas que se da en el proceso, sin embargo en la congelación esto no ocurre por la baja temperatura y la limitación de agua disponible.³

La rancidez oxidativa es uno de los más importantes tipos de degradación en una amplia variedad de alimentos. En este proceso el oxígeno reacciona con un ácido graso insaturado (autooxidación), que es una reacción en cadena de radicales libres, para producir compuestos primarios y secundarios que afectan la calidad del producto alimenticio.

Los hidroperóxidos, productos primarios de la autooxidación lipídica, intervienen en numerosas y complejas reacciones de ruptura e interacción, siendo los responsables de la formación de numerosos compuestos de diferentes pesos moleculares, importantes en el proceso de deterioro de la carne así como biológicamente significativos; lo que hace importante conocer su mecanismos.

Actualmente existe un interés cada día creciente, en el conocimiento de la oxidación de los lípidos por su relación con la salud; se conoce que las grasas y sus productos de deterioro juegan un papel importante en las enfermedades coronarias, arteroesclerosis, cáncer, etc.

Existen diversos factores que aceleran la autooxidación de los lípidos como: temperatura, enzimas, metales, presión de oxígeno, etc.; de los cuales se hablará con mayor detalle posteriormente.

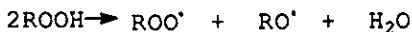
1.3.1. MECANISMO DE LAS REACCIONES DE AUTOOXIDACION

La autooxidación de las grasas tienen lugar por mecanismos típicos de radicales libres que comprenden 3 fases: iniciación, propagación y terminación.

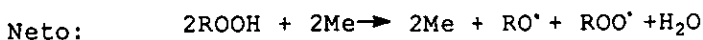
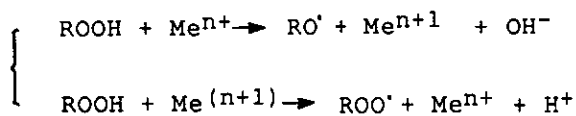
1.- La etapa de iniciación puede iniciarse por tres rutas principales. La primera es la iniciación por radiación electromagnética, por ejemplo por la luz, rayos gamma, etc.:



La segunda ruta es la iniciación por la descomposición de un hidroperóxido unimolecular o bimolecular:

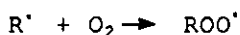


La tercera es la autooxidación catalizada por un metal:



Es evidente que el efecto neto de la descomposición del ROOH catalizada por el metal es la misma que en el caso de la descomposición bimolecular.⁷⁴

2.- En la segunda etapa, la propagación, los radicales libres son convertidos en otros radicales, éstos reaccionan entre sí, la reacción continúa entre el radical y el oxígeno para formar radicales peróxido:



A su vez estos últimos reaccionan con otros componentes para producir radicales peroxilos, hidroperóxidos y nuevos radicales hidrocarburos, que ayudan a mantener la reacción en cadena, al reaccionar con más oxígeno:



La propagación es un proceso de oxidación que se da por radicales libres, en este caso de lípidos, a través de una cadena de reacciones en la que se consume oxígeno y se producen radicales libres, o hidroperóxidos. Puede darse por dos mecanismos: por reacción con una molécula de oxígeno en estado de triplete o por remoción de un átomo de hidrógeno. La propagación es un proceso largo que dura tanto tiempo como exista disponibilidad de lípidos insaturados o moléculas de ácidos grasos disponibles.

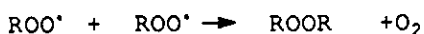
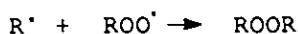
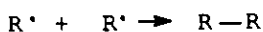
Los hidroperóxidos son los productos primarios de la autooxidación y son inodoros e insípidos, son relativamente inestables e intervienen en numerosas y complejas reacciones de ruptura e interacción para formar radicales alcóxilo y peróxilo, que son las responsables de la producción de innumerables compuestos de distintos pesos moleculares, capaces de producir aromas, y que son biológicamente significativos^{3,11}.

3.- La tercera etapa llamada de terminación o constitución de productos no radicales, es la etapa en la cual se da fin a las reacciones de oxidación, produciéndose compuestos muy variados en tiempos diferentes.

Los radicales libres tienen un electrón deslocalizado, y los efectos de solvatación son generalmente más pequeños. Estos son estructuralmente inestables, por lo tanto tienden a reaccionar lo más rápidamente posible para alcanzar la estabilidad, estas son las razones por las cuales los radicales libres son altamente inestables. Así las reacciones en la etapa de terminación interrumpen

la secuencia repetitiva de reacciones en la etapa de propagación.

Cuando ha disminuido la cantidad de lípidos insaturados disponibles los radicales libres se enlazan a otros para formar compuestos no radicales estables:



Es importante notar que los radicales reaccionan con otros radicales tan rápidamente como con el oxígeno; este apareamiento produce liberación de energía equivalente a la fuerza del enlace que está siendo formado, esta energía es liberada en forma de calor.¹¹

En presencia de un exceso de oxígeno, las combinaciones entre radicales libres alquilo, alcoxilo y peróxido dan lugar a una gran variedad de ácidos diméricos y poliméricos y acilgliceroles con enlaces carbono-oxígeno-carbono o carbono-oxígeno-oxígeno-carbono.³

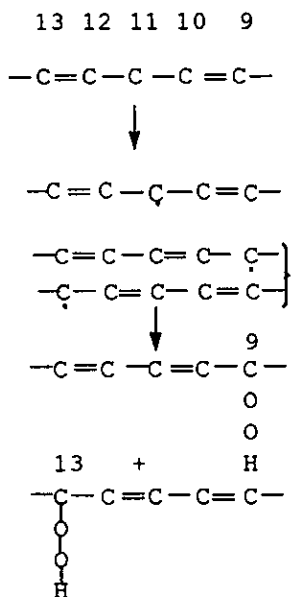
La medida de cualquiera de los compuestos producidos en el deterioro oxidativo de los lípidos nos permitirá evaluar la calidad química de las carnes almacenadas en congelación sin perder de vista las diferentes etapas de este proceso.

1.3.2. FORMACION DE HIDROPEROXIDOS

Durante el proceso de la autooxidación, el hidrógeno que está más débilmente enlazado, es el que se extrae del ácido graso insaturado.

Los hidrógenos alílicos, los que están unidos al átomo de carbono adyacente a un doble enlace, son los más fácilmente abstraídos que los hidrógenos vinílicos, unidos a carbonos involucrados en el doble enlace, y que los hidrógenos que están localizados en carbonos metilénicos entre dobles enlaces. Así, en el ácido oléico los enlaces más débiles están en las posiciones C8 y C11. El sitio más reactivo en el ácido linoleico es la posición 11, mientras que en el ácido linolénico tiene dos sitios reactivos, C11 y C14.⁸

Se citará como ejemplo el caso del ácido linoleico:



La sustracción de un hidrógeno de esta posición da lugar a un radical pentadiénilo intermedio, que al reaccionar con el oxígeno molecular produce una mezcla equitativa de hidroperóxidos 9- y 13-cis que se convierten a trans hidroperóxidos y además experimentan cierto grado de isomerización geométrica, dando lugar a isómeros trans-trans. Así, cada uno de los dos hidroperóxidos (9- y 13-) se presenta en ambas formas, la cis, trans y la trans, trans.³

1.3.3. OXIDACION CON OXIGENO SINGULETE

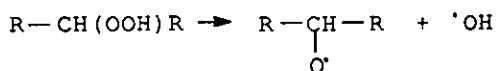
Es difícil explicar el origen de los primeros radicales libres necesarios para iniciar el proceso de autooxidación; es poco probable que esta iniciación tenga lugar mediante un ataque directo del oxígeno en estado triplete a los dobles enlaces de los ácidos grasos, ya que esta reacción no obedecería a la ley de conservación del spin. Una explicación más satisfactoria es la de que el oxígeno singulete (1O_2), una de las especies activas en el deterioro fotooxidativo, sea el responsable de la iniciación.³

El oxígeno en el estado singulete es más electrofílico que en el estado triplete y por lo tanto, puede reaccionar más rápidamente, en zonas de densidad electrónica altas, tales como en los dobles enlaces C = C. Los hidroperóxidos resultantes pueden entonces romperse para iniciar una reacción convencional en cadena por radicales libres.^{3,8}

1.3.4. DESCOMPOSICION DE HIDROPEROXIDOS

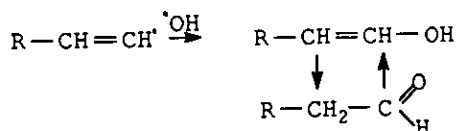
Los hidroperóxidos, a medida que avanza el proceso de oxidación, se van descomponiendo en una variedad de compuestos que incluyen aldehídos, cetonas y alcoholes.

El primer paso es la descomposición a los radicales alcoxilo e hidroxilo.⁸



La segunda etapa de esta descomposición es la ruptura del enlace carbono - carbono a uno u otro lado del grupo alcoxilo. En general, la ruptura por el lado

ácido da lugar a la formación de un aldehído y un ácido y la ruptura por el lado hidrocarbonado o metilo, resulta en un hidrocarburo y un oxoácido. Sin embargo, si en tal ruptura aparece un radical vinílico, se forma un grupo aldehído.



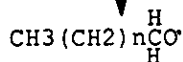
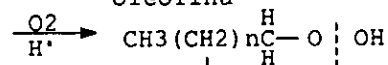
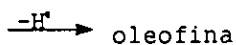
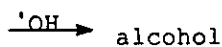
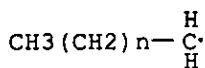
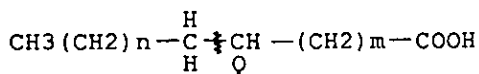
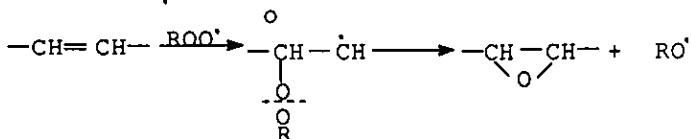
Los peróxidos cíclicos o con grupos hidroperóxidos, que se forman comúnmente en la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados también se descomponen dando una gran variedad de compuestos.³

1.3.5. DESCOMPOSICION DE ALDEHIDOS FORMADOS

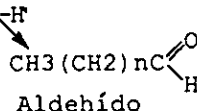
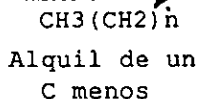
Los aldehídos son compuestos típicos mayoritarios obtenidos en la oxidación de las grasas. Sin embargo, muchos de los aldehídos encontrados en las grasas oxidadas no pueden explicarse únicamente a partir de la ruptura clásica de los hidroperóxidos.

Los aldehídos saturados pueden oxidarse fácilmente dando lugar a los ácidos correspondientes y pueden participar en reacciones de condensación y dimerización.

A continuación se presenta el mecanismo hipotético de formación de malonaldehído, por ser uno de los aldehídos más representativos y estudiados en el proceso de oxidación:³



ruptura del
enlace C-C



Por lo anteriormente citado, se observa que la oxidación lipídica es un proceso sumamente complejo en el cual ocurren numerosas reacciones para dar lugar a una gran variedad de compuestos; aunque ciertas etapas de este proceso siguen un modelo ya conocido, aun no se conoce en su totalidad este mecanismo tan complicado.

1.4. PRINCIPALES FACTORES QUE MODIFICAN LA AUTOXIDACION

Los alimentos son matrices muy complejas que contienen mezclas de ácidos grasos en diferentes proporciones, además numerosos compuestos no lipídicos que influyen en la velocidad de la oxidación de los lípidos, esto junto con las condiciones de almacenamiento y manipulación del alimento influyen en la cinética de oxidación. A continuación se presentaran los factores que influyen en este proceso.

1.4.1. ACTIVIDAD DE AGUA

La actividad de agua (a_w) es el principal factor que afecta la velocidad de la oxidación de los lípidos en los alimentos. Es bien conocido que en alimentos con muy bajo contenido de agua, la grasa de un alimento es rápidamente oxidada.

Pequeños cambios en la temperatura y otros factores que influyen sobre la actividad acuosa pueden producir cambios en la calidad y estabilidad del alimento, causando un incremento en la concentración o dilución de las especies reactivas; esto se asocia con variaciones en el color, aroma, sabor, textura, estabilidad y aceptabilidad de alimentos tanto crudos como procesados.^{16,17.}

Cuando una matriz alimenticia es sometida a congelación, la "deshidratación" que sufre ésta, debido a la formación de cristales de agua, permite que los componentes moleculares del alimento estén más cercanos, por lo tanto aumenta la posibilidad de que interactuen, así mismo se favorece el acceso de oxígeno. La autooxidación se da mas rápidamente en niveles de actividad acuosa bajos que son los que tienen los productos congelados, esto se relaciona con cambios estructurales en la matriz.^{14,18}

El agua interfiere con la descomposición bimolecular normal de los hidroperóxidos enlazando un hidrógeno con hidroperóxidos anfipolares formados en la interface lípido-agua.¹⁵

La disminución de la actividad acuosa en una matriz tan compleja como es un alimento trae las siguientes consecuencias:

1. Cambios en la hidratación de metales traza catalizadores, los cuales se vuelven más activos.
2. Cambios en la disponibilidad y movilidad de catalizadores metálicos, los cuales pueden moverse a la interfase lipídica y aumentar la velocidad de oxidación.
3. Enlaces de hidrógeno de intermediarios de peróxidos en la interfase acuosa, que llevan a éstos fuera de la reacción.
4. Aumento en la velocidad de reacción de los radicales libres con otras especies, tales como proteínas en la fase acuosa.¹⁶

Se conoce muy poco del efecto de la a_w en la etapa de terminación, pero se esperaría que se incremente la movilidad de las especies reactivas y por lo tanto se promueva la recombinación entre radicales libres, durante el almacenamiento en congelación.

La recombinación no se da únicamente entre compuestos lipídicos sino también las proteínas son fuertemente afectadas por la actividad acuosa . A baja actividad acuosa se promueve la producción de bases de Schiff debido a la formación de enlaces entrecruzados entre las proteínas con fragmentos bifuncionales de lípidos oxidados. Por otro lado, a bajas actividades acuosas los enlaces entrecruzados entre radicales libres predominan.

En sistemas que contienen agentes quelantes y antioxidantes, además en actividades acuosas altas, se produce la solubilización de estos compuestos, este efecto disminuye la velocidad de oxidación; sin embargo, por otro lado el agua

puede acelerar la oxidación por solubilización de catalizadores o por inducción al hinchamiento de las macromoléculas, tales como las proteínas.

En sistemas en los cuales existen lípidos en la superficie son fácilmente oxidados cuando se exponen al aire, si además están presentes lípidos encapsulados con polisacáridos o en la matriz de proteínas, estos no se oxidan hasta que la estructura que lo encapsula sea modificada o destruida por absorción de agua.¹⁷

1.4.2. COMPOSICION DE LA GRASA.

El número, posición y geometría de los dobles enlaces influye en la velocidad de oxidación. Las velocidades respectivas de oxidación relativas de los ácidos araquidónico, linoleico, linolénico y oléico están en una relación aproximada de 40:20:10:1.

Los ácidos grasos con interacciones en cis se oxidan más fácilmente que los isómeros trans, y los dobles enlaces conjugados son más reactivos que los no conjugados. La autooxidación de los ácidos grasos saturados es extremadamente lenta, de tal forma que a temperatura ambiente prácticamente no se han producido cambios en ellos cuando ya se detecta el enranciamiento por oxidación de los compuestos insaturados; sin embargo, a temperaturas altas los ácidos saturados pueden experimentar también una oxidación significativa.³

Los ácidos grasos libres se oxidan a mayor velocidad que cuando están esterificando al glicerol. Durante la congelación se eleva el número de ácidos grasos libres provenientes de la hidrólisis enzimática y no enzimática de los lípidos, especialmente de los fosfolípidos. La presencia de cantidades relativamente grandes de ácidos grasos libres, puede aumentar la incorporación de trazas de metales que pueden actuar como catalizadores y en consecuencia incrementar la velocidad de oxidación de los lípidos.

1.4.3. TEMPERATURA

En general, la velocidad de oxidación aumenta al incrementar la temperatura; la temperatura es también importante por el efecto que tiene sobre la presión parcial de oxígeno, y por lo tanto sobre la velocidad de oxidación; a medida que la temperatura aumenta, es menos importante el aumento de la velocidad si se incrementa la concentración de oxígeno, ya que el oxígeno se difunde dentro de la fase oleosa.³ A temperaturas bajas comprendidas entre -18°C a -26°C los ácidos grasos poliinsaturados se oxidan fácilmente.¹⁴ por lo que se recomienda almacenar las carnes a -30°C donde la velocidad de oxidación es menor.

1.4.4. OXIGENO

Si el suministro de oxígeno es ilimitado, la velocidad de oxidación es independiente de su presión parcial, pero cuando la presión de oxígeno es muy baja, la velocidad es aproximadamente proporcional a ella; sin embargo, el efecto de la presión de oxígeno sobre la velocidad depende de otros factores como la temperatura y el área superficial.^{3, 19}

1.4.5. MANIPULACION Y TIPO DE MUESTRA

Para el caso de la carne, es muy importante tomar en cuenta los cambios postmortem, la localización anatómica de músculos o tejidos, dieta del animal y manipulación de la muestra previa a la congelación ya que influirán en la velocidad de oxidación de la porción lipídica.

En la carne cocida, la oxidación es más rápida ya que la cocción podría desnaturalizar las membranas y liberar fosfolípidos, principal fuente de ácidos

grasos insaturados; también al moler la carne se produce ruptura de membranas celulares, con la consiguiente liberación de fosfolípidos.^{2, 20}

1.4.6. PAPEL DE LOS ANTIOXIDANTES EN LA INHIBICION DE FORMACION DE PEROXIDOS.

Los antioxidantes son sustancias que interfieren en la cadena de reacciones que se da durante la oxidación de los lípidos. El antioxidante reacciona con el radical libre original o con los radicales libres que se forman durante el proceso de oxidación para formar un intermediario que es incapaz de continuar con la cadena de reacciones en el proceso oxidativo.²¹

Para el uso de antioxidantes en alimentos se debe tomar en cuenta algunos aspectos como su necesidades tecnológicas, la toxicología de la sustancia, etc. Existen dos tipos de antioxidantes sintéticos y naturales.

La mayoría de los antioxidantes sintéticos son de tipo fenólico, radicando su diferencia en su estructura química, la cual influye en sus propiedades físicas como volatilidad, solubilidad y estabilidad térmica; los más comúnmente usados son el butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxotoluetno (BHT), terbutilhidroquinona (TBHQ), y propilgalato. Además se usan aminas aromáticas como la etoxiquinona, el EDTA, considerado un quelante fuerte, etc.^{11, 12}

Los antioxidantes naturales reaccionan mediante el mismo mecanismo que los sintéticos en el rompimiento de la cadena.¹¹

“Dentro de las sustancias naturales que tienen acción antioxidante podemos mencionar a la vitamina E, β -caroteno, ácido úrico y selenio. El ácido eritóbico y el ácido ascórbico actúan como atrapadores de oxígeno, donadores de hidrógeno

y quelantes".²² Además se ha informado el efecto sinergista del tocoferol con el ascorbipalmitado como antioxidantes.²³

1.5. CONSECUENCIA DE LA OXIDACION DE LOS LIPIDOS EN LOS ALIMENTOS.

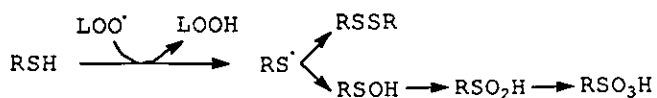
Como se mencionó anteriormente, la matriz alimenticia es un sistema complejo en el cual todos sus componentes interactúan, formando nuevos compuestos como en el caso de los productos de la oxidación de los lípidos. Además pueden formarse complejos proteína -proteína, proteína-carbohidrato, proteína-lípido, etc.

Todo esto trae como consecuencia alteración en las características nutritivas y sensoriales del producto. En el caso de la autooxidación se presentan los siguientes efectos.

a.- Daño de proteínas

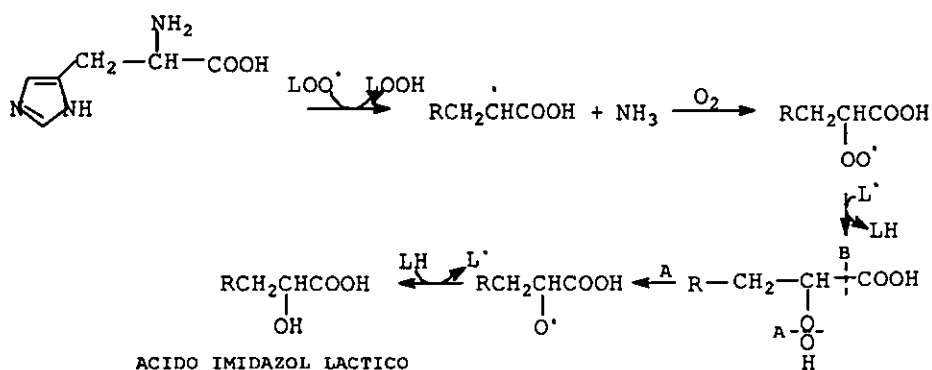
Tanto las proteínas como los péptidos y aminoácidos se ven afectados por los productos de oxidación de lípidos.

Se ha observado la formación de sulfóxido de metionina por interacción de los peróxidos con las proteínas, por otro lado los peróxidos pueden oxidar los residuos de cisteína a ácidos sulfónicos o mono, di, tri y tetrasulfóxidos los cuales son propensos a oxidaciones posteriores.^{11, 14} Como se muestra en la siguiente reacciones para el caso de la cisteína:²⁴



Los aminoácidos libres y residuos de aminoácidos por ejemplo, pueden sufrir una oxidación sustancial en presencia de productos de oxidación de las grasas, siendo más susceptibles la metionina, cisteína, histidina y lisina. De hecho los aminoácidos libres y los residuos de aminoácidos sufren una oxidación sustancial en presencia de peróxidos lipídicos.

Para el caso de la histidina, los lípidos peroxidados fomentan una reacción de radicales libres mediante la deasaminación y posterior descarboxilación del aminoácido para producir ácido ácido imidazol láctico o ácido imidazol acético. A continuación se presenta el mecanismo de formación del ácido imidazol láctico.²⁴



El malonaldehído, producto secundario de la oxidación de los lípidos, es altamente reactivo; reacciona principalmente con los grupos amino de los residuos de lisina, formando enlaces cruzados inter o intramoleculares.¹¹

Se han observado cambios de textura y color en carnes y pescados almacenados en congelación por la desnaturalización proteica, principalmente de las proteínas miofibrilares.¹⁴

b.- Olores y sabores desagradables

Los hidroperóxidos producidos durante la primera fase de la oxidación, son compuestos sin sabor. Los olores y sabores desagradables son producidos principalmente por aldehídos de cadena corta que son productos secundarios de la oxidación de las grasas, una vez que los peróxidos se descomponen. También estos compuestos de bajo peso molecular se pueden producir a partir del deterioro de proteínas.^{11, 14}

Como los productos responsables del mal olor y sabor en los alimentos son de bajo peso molecular no son evidentes a temperatura de congelación; para notar el aroma rancio en un producto congelado es necesario calentarlo o cocerlo así los compuestos comenzarán a volatilizarse y por lo tanto producir mal olor.

Los hidrocarburos formados tales como el pentano y el hexano, se encuentran en concentraciones bajas, por lo que no alteran el olor o sabor de la carne, a menos que el almacenamiento sea muy prolongado y se incremente su concentración.

c.- Cambio de textura y de color

Los compuestos monocarbonilos derivados de la oxidación de los ácidos grasos insaturados, fácilmente se condensan con los grupos amino libres de las proteínas formando bases de Schiff, que pueden producir polímeros de color oscuro (melanoidinas).^{11, 25} Estos cambios en color y apariencia para el caso de carne y pescado son irreversibles.

También se observan cambios en la textura debido al daño de las proteínas, que al desnaturalizarse interaccionan con los ácidos grasos liberados durante la congelación formando enlaces cruzados.^{3, 14}

d.- Pérdida de vitaminas

La oxidación de lípidos puede producir pérdida de valor nutritivo de los alimentos, especialmente por pérdida de ácidos grasos esenciales y vitaminas solubles en agua, así como producción de compuestos que podrían ser tóxicos para los humanos.²⁶

La disponibilidad de vitaminas solubles en grasa A, D, y E así como la vitamina C y el folato pueden reducirse durante la oxidación de los lípidos, generalmente en alimentos secos y deshidratados, por interacción de estas con los radicales libres generados durante la autooxidación.¹¹

1.6. IMPLICACIONES DE LA OXIDACION DE LOS LIPIDOS EN LA DIETA

La presencia de los productos de oxidación de las grasas formados tanto en las etapas iniciales como en las finales han sido asociados con diferentes tipos de enfermedades.

En un alimento que contiene ácidos grasos no oxidados, estos son capaces de pasar la barrera intestinal sin alteración y seguir las rutas metabólicas; en el caso de que se hayan oxidado siguen otras vías perdiéndose algunos que son esenciales.²⁷

Los productos de oxidación lipídica se consideran químicos tóxicos y se cree que son capaces de producir en el hombre procesos deteriorativos, induciendo a envejecimiento. Los radicales libres son capaces de causar daño por un ataque directo o indirecto en las moléculas biológicas.^{2,8}

La cardiotoxicidad de los productos de oxidación del colesterol ha sido sugerida por Taylor (1979), jugando un papel importante en enfermedades coronarias.

Los ácidos grasos poliinsaturados pueden aumentar el riesgo de cáncer, aparentemente por su gran propensión a la autooxidación. Otros compuestos involucrados con los lípidos de la dieta en el desarrollo del cáncer son productos de oxidación del malonaldehído.

Los niveles de hidroperóxidos normalmente encontrados en los músculos de alimentos son relativamente bajos y probablemente no representan un peligro para la salud del hombre.

Algunas sales y acetales del malonaldehído (como el tetraepoxipropano), son tóxicos en ratas. Se demostró que el malonaldehído forma enlaces cruzados con los grupos amino de la guanina y la citosina en la molécula del DNA; además que causa mutagénesis en algunas cepas de *Salmonella*. Sistemas modelos estudiaron la acción del malonaldehído como catalizador en la formación de N-nitrosaminas, en alimentos que contienen aminas secundarias y nitritos; muchas de éstas son carcinogénicas.^{28, 29}

1.7. CARACTERIZACION DE LOS PRODUCTOS DE OXIDACION

Conociendo que el mecanismo de oxidación de lípidos se da en todos los alimentos que contienen grasa, es necesario realizar un análisis del producto para saber las condiciones en las que se encuentra éste. Para esto existen diversos métodos que nos permiten evaluar los compuestos producidos en la oxidación de las grasas tanto en las etapas inicial, intermedia, así como en la final.

Ninguna prueba individual puede medir todas las reacciones de oxidación de una vez. Existen técnicas que nos permiten analizar un cambio determinado en el contenido lipídico durante el proceso de oxidación sin la previa extracción de la

muestra, pero la mayoría requieren la extracción de la grasa para aplicar las técnicas analíticas.

Dentro de los métodos desarrollados hasta ahora se mencionarán los más comúnmente empleados.

1.7.1. CONSUMO DE OXIGENO

Una forma de medir la estabilidad de una muestra es medir la cantidad de oxígeno absorbido dada por el tiempo necesario para hacer bajar la presión específica en una cámara cerrada, o por el tiempo para absorber una cantidad preestablecida de oxígeno en condiciones de oxidación específicas. Este método de análisis ha sido particularmente útil en los estudios de actividad antioxidante.³

1.7.2. DETERMINACION DE ACIDOS GRASOS.

Existen diferentes métodos para la cuantificación de ácidos grasos que se pueden realizar en seguimiento del contenido de éstos en una muestra. Con el avance de la oxidación de la muestra se observará una pérdida o decremento de ácidos grasos.

La determinación de los ácidos grasos se puede realizar mediante técnicas instrumentales muy precisas como es el caso de la cromatografía de gases, para la cual se requiere la previa formación de ésteres metílicos.³⁰ También se usa la cromatografía líquida de alta resolución en la cual no se requiere la liberación de los ácidos grasos, ya que es posible analizar glicéridos íntegros.³¹

Ultimamente se ha estado empleando la calorimetría para medir la temperatura de transición de los diferentes compuestos de la grasa.¹⁸

Se ha propuesto el uso de resonancia magnética nuclear para demostrar la presencia o ausencia de ácidos grasos así como la determinación mediante el espectro infrarojo cercano.^{32, 33, 34}

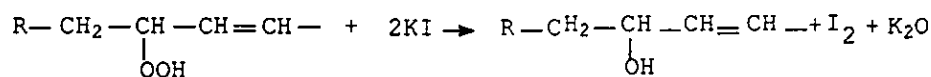
Para todos los casos anteriormente citados se requiere la previa extracción de la grasa del material en estudio.

1.7 3. INDICE DE HIDROPEROXIDOS

La cuantificación de los hidroperóxidos ha tomado gran importancia para la evaluación del grado de deterioro que ha alcanzado determinada muestra, ya que éstos son los primeras especies formadas durante el proceso de oxidación. Se ha encontrado que la velocidad de formación de los hidroperóxidos tiene correlación positiva con la cantidad de ácidos grasos con doble enlace presentes en la muestra.³⁵

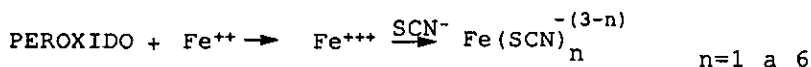
Todos los métodos existentes para la cuantificación de los hidroperóxidos requieren la previa extracción de la grasa.

El método más importante e informado como oficial por la AOAC,³⁶ se lleva a cabo a través de la oxidación del ion yoduro, del yoduro de potasio, con la producción de yodo, que se valora con una solución de tiosulfato de sodio, como se observa en la siguiente reacción.³⁷



Se ha demostrado que la peroxidación de los lípidos es fuertemente acelerada por los ácidos, por lo que se sugiere que este ensayo se haga en medio con concentración ácida baja.³⁸

Se han propuesto métodos fotométricos para cuantificar estos productos de la oxidación de las grasas, siendo superiores a la titulación yodométrica; en éstos métodos se utiliza hierro que en su forma oxidada reacciona con el tiocianato de amonio para formar un complejo colorido, la reacción es estequiométrica y la intensidad de la coloración es directamente proporcional a la concentración de peróxidos.^{39, 40, 41, 42} A continuación se presenta la reacción.⁴³



Si se realiza una comparación del método volumétrico con el colorimétrico, se observa una estequiometría diferente, pues mientras en la técnica yodométrica se transfiere dos electrones por cada peróxido, en la técnica colorimétrica la reducción con Fe II se transfieren aproximadamente cuatro electrones.⁴⁰

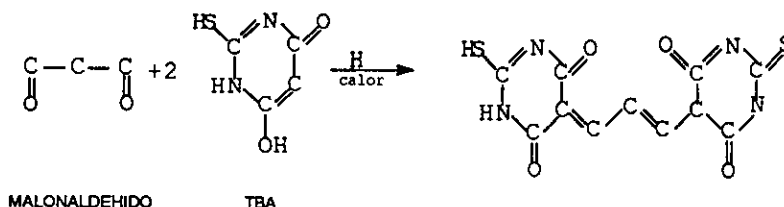
Se han mencionado diversos métodos para determinar peróxidos: enzimáticos en los que se emplea una hidroxilasa,²⁰ por espectroscopía de transmisión infrarrojo de Founer, que tiene la ventaja de ser un método rápido;⁴⁴ otro método es por quimiluminiscencia,⁴⁵ etc.

Recientemente se han medido los peróxidos por HPLC usando detector UV y ELSD (evaporative light-scatterin detector).^{46, 47, 48} Para facilitar su caracterización se recomienda también el hidroxilarlos^{35, 49}

1.7.4. ANALISIS CON ACIDO TIOBARBITURICO (TBA)

Con este análisis se cuantifica el malonaldehído (MAD), que es un producto derivado de los aldehídos insaturados que resultan del rompimiento de los hidroperóxidos, por lo tanto, mide los productos secundarios de la oxidación de los lípidos.

El principio de la cuantificación se basa en la reacción del malonaldehído con el ácido tiobarbitúrico para formar un complejo rojo TBA-malonaldehído, el cual puede ser cuantificado espectroscópicamente.^{50, 51}



El análisis de ácido tiobarbitúrico puede ser realizado de las siguientes maneras:

- a) Extracción de malonaldehído de la carne por destilación⁵²
- b) Calentamiento directo de la muestra con TBA, seguido de la separación del pigmento rojo producido,
- c) Reacción de la porción de extracto lipídico con TBA, los informes demuestran que este método es superior al método de destilación.^{53, 54}
- d) Extracción del malonaldehído con una solución acuosa-ácida seguida por reacción con TBA.⁴⁸

El último método es preferido por ser simple y tener alta correlación con las pruebas sensoriales y ser el más reciente.

Numerosas sustancias además del malonaldehído reaccionan con el TBA, por eso se habla de "sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico " o TBARS.^{6, 26} Dentro de estas sustancias tenemos azúcares, aldehídos, pigmentos biliares, alcanos, alquenos y dienos.^{29, 55, 56} La proporción de sustancia que interfieren con el MAD producidas durante el análisis del TBA dependerá del estado de la muestra, cruda o cocida, del pH y del tipo de método usado.^{57, 58}

La cuantificación del MAD por destilación presenta algunas desventajas, como largo tiempo de destilación y bajo poder de recuperación de MAD, no mayor al 88%.^{28, 53} El calentamiento libera el MAD unido a las proteínas pero incrementa la producción de aldehídos y rompe ciertos productos carbonilos, por lo que algunos autores recomiendan el uso de antioxidantes durante el análisis.^{53, 59}

En el caso de la cuantificación por extracción el MAD es liberado por el ácido perclórico. El estándar comúnmente usado para esta prueba es el 1,1,3,3 tetraetoxipropano, precursor estable del MAD.^{22, 53, 56}

Algunas investigaciones modernas han introducido el análisis por la separación cromatográfica de los compuestos reactivos ya sea por HPLC o CFV.^{28, 29, 60}

1.7.5. INDICE DE KREIS.

El índice de Kreis uno de los primeros análisis utilizados comercialmente para evaluar la oxidación de las grasas.

Esta prueba se fundamenta en la formación de un color rojo cuando el floroglucinol reacciona con el aldehído epihidrina o el malonaldehído. En esta prueba se desarrolla color en muestras frescas que carecen de aromas oxidados.^{3, 37} Debido a su elevada sensibilidad, la prueba de Kreis suele dar resultados

confusos cuando se trata de colores producidos por aceites relativamente frescos.^{61, 62}

Se ha visto que esta prueba se ve afectada por compuestos carbonilos volátiles que pueden contener la muestra haciendo de esta prueba inespecífica y poco sensible.⁴²

1.7.6.OTRAS DETERMINACIONES

Existen numerosas técnicas para determinar y cuantificar tanto los compuestos primarios como los secundarios formados durante la oxidación de los lípidos, dentro de estas tenemos:

Determinación de compuestos volátiles formados en las etapas finales como pentanal, hexanal, heptanal, octanal, etc mediante cromatografía de gases. La recuperación de compuestos volátiles de la carne por destilación requiere elevadas temperaturas que pueden causar formación de productos de descomposición y pérdida de compuestos originales. Se puede disminuir este efecto destilando la muestra al vacío.^{26, 30}

Cuantificación de ácidos grasos libres, diglicéridos, triglicéridos, compuestos polares mediante HPLC, usando cromatografía de fase inversa y diferentes tipos de detectores como ultravioleta, infrarojo, índice de refracción, ELSD, etc.^{63, 64, 65}

En muchos estudios se está empleando la derivatización de la muestra con una precolumna para la cuantificación de estos compuestos por HPLC, ya que se incrementa la sensibilidad de detección de los agentes derivatizados, evitando los problemas en la detección más que las dificultades en la separación.⁶⁶ Otros autores informan que se mejora la separación usando HPLC en fase reversa,^{9, 67} y

se informa también extracción en fase sólida.⁶⁸ Varias técnicas presentan algunos inconvenientes:

1.- No son específicas para los compuestos que se están determinando.

2.- No son fácilmente interpretadas, puesto que no existen un valor de referencia común a los distintos aceites y grasas³⁰

Considerando que los lípidos son mezclas muy complejas, no existe una técnica completamente satisfactoria por lo que se recomienda usarse dos o más técnicas para seguir o conocer el estado de rancidez en el que se encuentra determinado producto.⁶⁹

De esto se concluye que los siguientes métodos son los más representativos para evaluar el grado de deterioro del material lipídico:

Índice de peróxidos, con sus dos variantes, el método volumétrico que es el oficial y sirve como parámetro de comparación; así como el método colorimétrico que presenta las siguientes ventajas: es muy rápido, la cantidad de muestra que se requiere es mínima, es muy sensible y presenta alta repetibilidad y reproducibilidad.

Índice de ácido tiobarbitúrico: este método es rápido, se realiza de manera directa en muestras frescas con alto contenido de humedad, además presenta repetibilidad y reproducibilidad.

El índice de Kreis es rápido y también presenta repetibilidad y reproducibilidad.

1.8. EXTRACCION DE GRASA Y PRODUCTOS DE OXIDACION

Un aspecto muy importante en la definición del procedimiento analítico a utilizar para evaluar el grado de rancidez en el que se encuentra una carne, es la naturaleza del material que se empleará para aplicar las diferentes pruebas.

Como se puede observar en la descripción de los métodos, la mayoría de los procedimientos requieren la extracción de la grasa; en consecuencia, el tipo de disolvente usado para la extracción será un paso crítico en el análisis del deterioro oxidativo de las grasas. Esto debido a la gran complejidad de los compuestos producidos durante el procesos así como por la complejidad de las grasas animales, para evitar un deterioro adicional al ya producido durante la autooxidación.

Existen diferentes métodos de extracción de grasa así como mezclas de disolventes utilizados para la extracción de la fracción grasa de una muestra.

1.8.1. METODOS DE EXTRACCION DIRECTA CON DISOLVENTES

El contenido de lípidos libres, los cuales consisten fundamentalmente de grasas neutras y de ácidos grasos libres, se puede determinar en forma conveniente en los alimentos por extracción del material seco y reducido a polvo fino con una fracción ligera de petróleo o con éter etílico en un aparato de extracción continua por medio de un Soxhlet.

El método de Soxhelt es el método oficial para la AOAC³⁶ y se usan como disolventes el éter de petróleo, n-hexano o éter etílico, aunque como se mencionó al inicio, estos disolventes extraen solo los lípidos libres y muy pocos componentes no lipídicos, como azúcares, de la matriz alimenticia.⁷⁰

Para estos tipos de extracciones se puede utilizar mezclas de disolventes polares como cloroformo-metanol, útil en los casos que se requiere información de la composición lipídica total del material que se está analizando.³⁰

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 alimenticia se logra extraer fácilmente por cualquiera de estos tres tipos de disolventes, pero es necesario realizar el calentamiento de la muestra; y en muestras con alto contenido de humedad como es el caso de la carne, se requiere la previa eliminación del agua mediante liofilización, secado en horno, etc.⁷¹

Como se citó anteriormente la temperatura es uno de los factores que favorecen la oxidación, lo que nos daría resultados erróneos de la calidad o grado de rancidez que presenta la muestra objeto de análisis.

Otra técnica de extracción directa con disolventes es la de Bligh y Dyer, modificada por Hanson y Olley (1963) en la que se homogeneiza el alimento húmedo con metanol y cloroformol en proporciones tales que forman una fase sencilla miscible con el agua en los alimentos. Al adicionar posteriormente cloroformo y agua se separan dos fases con los materiales lipídicos en la capa de cloroformo.³⁷ Hagan y col. demostraron que el método de Bligh y Dyer extrae cantidades más grandes de lípidos totales que los procedimientos citados por la AOAC,^{30, 36} también es recomendado por diversos autores por ser un método rápido, adecuado para muestras con alto contenido de humedad, y no usa altas temperaturas por lo tanto no va a modificarse la grasa al determinar el grado de oxidación de un muestra.^{70, 72, 73}

También se conoce el método de extracción continua por percolación o lavado continuo del material con el disolvente, aquí se mantiene el disolvente a ebullición conectado a un sistema de enfriamiento, 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 recipiente de material poroso; podemos citar como ejemplo el método de Goldfish. La desventaja de este método es el contacto de la muestra con los vapores del disolvente en caliente, pudiendo acelerar la oxidación lipídica, además de mantener a la grasa extraída en continuo calentamiento.⁷

1.8.2. METODOS DE EXTRACCION POR SOLUBILIZACION

Los lípidos asociados pueden ser liberados si la muestra del alimento se disuelve completamente antes de hacer la extracción con disolventes polares. La disolución del alimento se puede lograr por hidrólisis ácida o alcalina.

En el método ácido, proceso de Wernerchmid, el material es calentado en baño de agua hirviendo con ácido clorhídrico para romper las proteínas y separar la grasa como una capa que flota sobre el líquido ácido; la grasa se puede recuperar separándola del ácido y las proteínas mediante una extracción con éter. La hidrólisis puede descomponer los fosfolípidos. En este tipo de extracción se obtiene un bajo rendimiento de los lípidos extraídos.⁷¹

En la disolución usando álcali, método de Rose-Gottlieb, el material se trata con amoníaco y alcohol en frío y la grasa se extrae con una mezcla de éter y petróleo ligero. Este método es adecuado para la grasa en lactinios y en materiales que contienen mucha azúcar como la leche condensada endulzada.³⁷

1.8.3. METODOS VOLUMETRICOS

Estos consisten en disolver la muestra en ácido sulfúrico y separar la grasa por centrifugación en tubos de vidrio calibrados especialmente; existen dos variantes: el método de Babcock usado en Estados Unidos, y el método Gerber usado en Europa. Estos métodos se usan comúnmente en el análisis de la leche.³⁷

1.8.4. METODOS FISICOS

Además de los métodos clásicos, se han desarrollado técnicas que miden los cambios en las propiedades físicas por la presencia de grasa en la solución, por ejemplo, el índice de refracción, la gravedad específica, la impedancia y la capacitancia. La resonancia magnética nuclear, (NMR) de baja resolución se usa para determinar grasa en una variedad de alimentos y productos agrícolas.⁶²

Sin embargo, éstos no son métodos de extracción, solo permiten cuantificar a los lípidos dentro de la matriz en que se encuentran.

1.8.5. TIPOS DE DISOLVENTES EMPLEADOS

Se han realizado numerosas investigaciones con diferentes disolventes, y mezclas de éstos, usando diferentes métodos de extracción para cuantificar y analizar la calidad de la grasa; se han empleado los siguientes disolventes:

Eter etílico que remueve rápida y fácilmente triglicéridos, ácidos grasos insaturados y ácidos grasos de bajo peso molecular, así como determinadas impurezas. Tetracloruro de carbono que remueve más lípidos que el éter y probablemente más impurezas. Disulfuro de carbono que remueve aceites, grasas, ceras, resinas y muchas otras sustancias; presenta la desventaja de ser

muy tóxico. El benceno y alcohol extraen grasas, aceites, ceras, esteroides, fosfolípidos, cerebróidos, lecitinas, etc.⁷⁴

La acetona no es apta para la extracción de fosfolípidos.⁷⁵ Los fosfolípidos por su naturaleza polar son extraídos mejor por mezclas de solventes más polares como por ejemplo hexano-isopropanol y cloroformo-metanol.⁷⁶

Mezclas cloroformo-metanol son altamente eficientes para el análisis de lípidos totales oxidados y no oxidados.⁷⁵

Para mejorar el proceso de extracción se deben emplear mezclas de solventes de diferentes polaridades que permiten una mejor extracción penetrando en los tejidos biológicos, rompiendo enlaces iónicos y fuerzas de Van der Waals.⁷³

La mezcla cloroformo-metanol (escasamente polar-muy polar), que es muy utilizada, presenta la desventaja de contener cloroformo que se considera una sustancia muy tóxica y carcinogénica,^{4, 77, 78} Como consecuencia surgieron numerosos estudios para el empleo de disolventes alternativos que ofrezcan la misma o parecida eficacia del cloroformo; éstos recomiendan su sustitución por diclorometano ya que se obtienen los mismos rendimientos y además es una sustancia con una toxicidad mucho menor.^{11, 72, 79, 80.}

Por todo lo anteriormente expuesto un buen criterio para evaluar un método válido para extracción de lípidos, es la calidad y cantidad de lípidos recuperados; así como la mínima contaminación de la grasa con sustancias extrañas, por ejemplo proteínas, lo cual nos puede asegurar una buena caracterización de la muestra luego de su extracción.

2. MATERIALES Y METODOS

ESTRATEGIA:

En estudios anteriores realizados en carne de res y pescado concluyen que el disolvente de extracción es sumamente importante cuando se trata de cuantificación y 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.⁸¹

Por lo tanto, con el fin de determinar él o los métodos válidos para seguir y conocer la calidad de las grasas y el grado de deterioro oxidativo que éstas podían sufrir en carne de cerdo y pollo al ser almacenadas en congelación a una temperatura de -18°C , durante períodos de tiempo prolongados, se propuso encontrar el sistema de disolventes más adecuado para la extracción de los productos de oxidación en la grasa.

Una vez conseguido esto se podrá establecer parámetros válidos para conocer la calidad de la carne.

El trabajo se dividió en dos etapas: en la primera se realizó la implementación de las metodologías de extracción y cuantificación de grasa total así como técnicas para la cuantificación de los productos de oxidación de los lípidos en sistemas modelo y en muestras problema: carne de pollo y cerdo. La segunda etapa involucra el monitoreo, a partir de muestras controladas, que fueron almacenadas en congelación por un tiempo aproximado de doce meses.

Para el monitoreo en el caso de cerdo se usó chuleta y para el caso del pollo se trabajó con el pollo completo incluyendo la piel, que son presentaciones usualmente almacenadas en congelación. Muestras de pollo y chuleta de cerdo,

correspondiente al músculo largo dorsal, se obtuvieron frescas y de manera aleatoria en el supermercado de la Universidad Nacional Autónoma de México. El lote almacenado se obtuvo en un solo tiempo el día 1 de octubre de 1996, y fue almacenado 348 días a -18°C en un congelador comercial.

Todos los reactivos utilizados fueron grado analítico.

2.1. 1era. ETAPA: VALIDACION DE LAS METODOLOGIAS

Se realizaron inicialmente las determinaciones en muestras de carne de cerdo molida comercial y en pollo completo molido, luego se trabajó con las muestras seleccionadas.

2.1.1. EXTRACCION Y CUANTIFICACION DE LIPIDOS

2.1.1.1. Método de Bligh y Dyer²²

Pesar de 2 a 20g de muestra preparada, (correctamente homogeneizada) y previamente determinada la humedad, en un vaso mezclador. Adicionar agua destilada suficiente para llevar a un total de 16ml junto con 40ml de metanol y 20ml de diclorometano.

Macerar 2min y agregar 20ml de diclorometano y homogeneizar por 10s en un homogeneizador de laboratorio de marca Waring Commercial, a alta velocidad, agregar 20ml de agua destilada y macerar de nuevo durante 30 segundos. Centrifugar, centrifuga marca Beckman J2-21M/E, la mezcla 10min de 2000 a 2500 r.p.m. Extraer la capa de diclorometano sin perturbar lo demás y filtrar a través de papel filtro grueso (Whatman # 2).

Se modificó el tiempo de maceración de 30s a 60min para ambos tipos de muestra. En todas las metodologías utilizadas para la realización de este trabajo, se sustituyó el cloroformo por diclorometano.

Para la determinación del extracto lipídico total tomar 25ml de filtrado claro y pasarlo a un vaso a peso constante, evaporar el diclorometano a sequedad sobre baño de vapor y continuar el secado en una estufa a 105°C hasta peso constante.

2.1.2. SELECCION DE DISOLVENTE

Con el fin de optimizar la extracción de la grasa y los productos de oxidación lipídica contenidos en las muestras problema, se trabajó con éter de petróleo, éter etílico y la mezcla diclorometano-metanol, para contar con disolventes de diferentes polaridades.

2.1.3. METODOS DE ANALISIS DE DETERIORO DE LIPIDOS

2.1.3.1. Índice de peróxidos

Es la medida de los peróxidos, compuestos formados durante las primeras etapas de oxidación de los lípidos.

a.- Método de la AOAC ³⁶

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.

Procedimiento:

Pesar 5.00 ± 0.05 g de muestra en un matraz Erlenmeyer de 250ml . Añadir 30ml de ácido acético-diclorometano (3:2 v/v) y agitar para disolver la grasa.

Añadir 0.5ml de solución saturada de yoduro de potasio y dejar reposar por 1min moviendo ocasionalmente; añadir 30ml de agua destilada.

Titular con una solución 0.1N de tiosulfato, con agitación vigorosa hasta que el color amarillo haya desaparecido casi completamente. Añadir 0.5ml de solución de almidón al 1% y continuar la titulación agitando para liberar todo el yodo del diclorometano, hasta que el color azul desaparezca.

Si se utilizó un volumen menor a 0.5ml de tiosulfato de sodio 0.1N, repetir la determinación con tiosulfato de sodio 0.01N. El blanco debe ser menor o igual a 0.1ml de tiosulfato de sodio 0.1N y se debe correr en cada determinación.

Cálculos:

Valor Peróxido(meq peróxido/kg de muestra) = $S \times N \times 1000 / g$ de muestra

S = ml de tiosulfato de sodio corregido con el blanco

N = normalidad del tiosulfato de sodio

b.- Método Colorimétrico ³⁷

El método se basa en la capacidad de los peróxidos para oxidar los iones ferrosos (FeII) a férricos (FeIII). Se cuantifica midiendo el compuesto de color rojo producido por la formación de un complejo entre el tiocianato y el ion férrico.

Procedimiento:

Se pesa exactamente de 15mg a 0.3g de muestra de grasa (W) en un tubo de ensayo. Se añade diclorometano:metanol 70:30 (v/v) hasta un volumen de 9.9ml y se mezcla para disolver la muestra. Se adiciona 0.05ml de solución de tiocianato de amonio (30% m/v, reactivo grado analítico), se mezcla y se mide absorbancia a 500nm (Ab0) contra un blanco de la mezcla diclorometano:metanol 70:30. Se adiciona 0.05ml de solución de cloruro ferroso (0.35% que contiene 2% de HCl 10N). Se mezcla y después de exactamente 5min se mide la absorbancia de nuevo a 500nm (Ab2), simultáneamente se efectúa una determinación de un blanco de reactivos (Ab1).

Para preparar una curva de calibración de absorbancia se usó una solución patrón de cloruro férrico que contiene 20ppm de Fe: se pesan 0.242g de cloruro férrico pentahidratado en un matraz aforado, llevar a 50ml con una mezcla de diclorometano - metanol 70:30, de esto se toma 1ml y se afora a 50ml con la mezcla diclorometano:metanol.

Se realiza una curva patrón con diez tubos usando volúmenes de 0.25 a 2ml de patrón agregando al primer tubo 9.65ml y al último 7.9ml de la mezcla diclorometano:metanol 70:30 para obtener concentraciones de 5 a 40 µg de Fe. Se añade 0.05ml de tiocianato de amonio y 0.05ml de ácido clorhídrico 0.2N y se mide la absorbancia a 500nm frente a un blanco de reactivos.

Cálculos:

Si m es el número de µg de Fe y éste viene dado por: $Ab2 - (Ab0 + Ab1)$

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

Se utilizó este método con las variaciones realizadas por Donoso (1996),⁸¹ que fueron la reducción del tamaño de la muestra de 0.3g a un rango de 15mg a 0.3g y la sustitución de cloroformo por diclorometano.

2.1.3.2. Índice de TBA.⁵⁰

La determinación se basa en la reacción de una molécula de malonaldehído con dos moléculas de ácido tiobarbitúrico para formar un complejo rojo TBA-malonaldehído, el cual puede ser cuantificado espectroscópicamente.^{50,51}

Procedimiento:

Mezclar 10g de muestra cruda con 15ml de ácido perclórico frío al 9% y 10 ml de agua destilada fría, en un homogeneizador de alta velocidad, (marca Waring Commercial) por 10s. La mezcla se afora a 50ml con agua destilada y filtrar en papel Whatman # 2. A 5ml del filtrado añaden 5ml de TBA 0.02M, mezclar en un tubo con tapa rosca, e incubar por 17h a temperatura ambiente en la obscuridad o en baño de agua hirviente por 30min. Medir la absorbancia a 530nm contra un blanco de reactivos.

Preparar una curva de calibración para calcular la concentración usando una solución patrón de 1,1,3,3 tetraetoxipropano 1×10^{-3} M, de esta solución tomar de 10 μ l a 80 μ l y llevar a 5ml con agua para obtener concentraciones que van de 1×10^{-8} hasta 8×10^{-8} M. Adicionar 5ml de TBA 0.02M y proceder como con las muestras.

Cálculo:

Índice de TBA = Moles de TEP $\times 2 \times 1000 \times 1000 \times 72 \times$ dilución / gmuestra
= mg MAD /kg muestra.

2.1.3.3 Índice de Kreis⁸⁴

La prueba se basa en la formación de un color rojo cuando el floroglucinol reacciona con el aldehído epihidrina o el malonaldehído.³

Procedimiento:

Disolver 0.05 - 5.00ml de grasa en 5ml de diclorometano, se añaden 10ml de la solución de ácido tricloroacético glacial al 30% en ácido acético glacial, y se adiciona 1ml de floroglucinol al 1%. Se agita e incuba por 15min en baño maría a 45°C. Se deja enfriar y se le agregan 4ml de etanol.

Se corre simultáneamente un blanco de reactivos. Medir absorbancia a 545nm. Para la obtención del índice de Kreis se utiliza la siguiente fórmula:

$$IK = \frac{A_m - A_b}{l \times c} = D.O./gr \text{ grasa}$$

En 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.

Se usaron las modificaciones realizadas al método por Donoso (1996).⁸¹

2.2. 2da. ETAPA: MONITOREO DEL DETERIORO OXIDATIVO DE LIPIDOS EN CARNE DE CERDO (CHULETA) Y POLLO CONGELADOS.

2.2.1 PREPARACION DE LAS MUESTRAS

a.-Carne de Cerdo

Para iniciar el monitoreo de esta carne, se procedió a almacenar charolas que contenían 0.5kg aproximadamente, de chuleta de cerdo. Estas charolas estaban cubiertas por polietileno transparente, el mismo que se utiliza para almacenamiento comercial de las carnes. La temperatura de almacenamiento fue de $-18 \pm 2^{\circ}\text{C}$ (Refrigerador Whirpool modelo ED25DQ), y durante un tiempo aproximado de doce meses.

El monitoreo se realizó desde el tiempo cero para constatar la frescura de las muestras y luego se realizaron análisis periódicamente en intervalos variables que dependían de la velocidad de oxidación de la muestra, cada 2 o 3 semanas aproximadamente.

b.- Carne de Pollo.

Para el caso del pollo su almacenamiento se realizó en pollos completos, seleccionados al azar y empacados en polietileno comercial. La temperatura de almacenamiento fue de $-18^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y durante un tiempo aproximado de doce meses.

El monitoreo inició en el tiempo cero, con el fin de asegurar la frescura de las muestras y los análisis se realizaron periódicamente cada dos o tres semanas según iba evolucionando el deterioro de las muestras.

2.2.2. EXTRACCION DIRECTA DE LIPIDOS Y PRODUCTOS DE OXIDACION CON DISOLVENTES.

El método usado fue el de Bligh y Dyer,⁶² como se describió en la primera etapa.

2.2.2.1 Cuantificación de lípidos totales

La cuantificación se llevo a cabo de la manera descrita en la primera etapa de este trabajo.⁶²

2.2.2.2.Cuantificación de los productos de oxidación de lípidos en las muestras en almacenamiento.

Para determinar los índices de oxidación de las muestras se utilizaron los siguientes métodos:

Para los peróxidos, productos iniciales de oxidación, se utilizaron el método oficial de la AOAC que es volumétrico y el método colorimétrico.

Para la cuantificación de los productos de las etapas finales se utilizaron los métodos de Índice de TBA e Índice de Kreis. Todos los métodos anteriormente citados fueron descritos en la primera etapa de este trabajo.

2.2.3. ANALISIS ESTADISTICO

El análisis estadístico de los resultados obtenidos en una experimentación es indispensable con el fin de que los resultados sean confiables y se vean afectados en el menor grado posible por fuentes externas de variabilidad.

Para este trabajo se usaron los siguientes diseños:

Análisis de varianza para un diseño completamente aleatorio, implica el estudio de una variable dependiente por medio de una variable independiente; se utiliza para determinar si la variable independiente presenta o no un efecto significativo, sobre la respuesta evaluada.

Análisis de varianza para un diseño en bloques: este diseño permite reducir el error experimental en los casos en donde la aleatorización es restringida para una de las variables estudiadas. Así la variable que puede afectar los resultados experimentales se separa en bloques y dentro de cada bloque se distribuyen al azar los tratamientos a estudiar. Se utiliza además cuando se quiere evaluar el efecto de las repeticiones.

Los dos análisis anteriores se emplearon para conocer el efecto del disolvente en la cuantificación de lípidos totales, el tiempo óptimo de maceración usando la técnica de Bligh y Dyer modificado, para ambos tipos de muestra.

Cuadrado latino, que es una combinación de dos sistemas de bloques. Tiene la ventaja de que permite obtener un máximo de información con una cantidad mínima de unidades experimentales. En la mayoría de los casos los dos factores se pueden controlar con mayor precisión y resulta más eficiente este diseño que uno totalmente aleatorio para cada variable. Se caracteriza por que el experimento no tiene repeticiones como tal.⁸⁵ Se utilizó para conocer el efecto del disolvente usado para la cuantificación de peróxidos tanto para la carne de cerdo como para la de pollo.

Los análisis anteriormente citados serán complementados con las pruebas de rango múltiple que nos ayuda a concluir cual es el tratamiento adecuado; dentro de éstas la prueba de Duncan es la que tiene el nivel de exigencia mayor.⁸⁵

3. RESULTADOS: ANALISIS Y DISCUSION.

Los resultados de los análisis estadísticos realizados en este trabajo se presentarán en el apéndice.

El la primera etapa se realizó un estudio sobre los métodos de extracción de lípidos, así como del efecto de los diferentes disolventes en la cuantificación de lípidos y las técnicas empleadas para determinar el estado de rancidez oxidativa en el que se encuentra un producto.

Para la extracción se probó el método de Bligh y Dyer⁸²

Aunque el método de Goldfisch es el oficial (AOAC),³⁶ este presenta algunas desventajas: requiere de muestras secas para la extracción de la grasa; y durante el proceso de extracción la muestra está en contacto el disolvente caliente. Conociendo que la carne es un alimento con alto contenido de humedad, es necesario secarlo primero para poder proceder a la extracción de la grasa; tanto en el secado como durante la extracción el calor aplicado afectaría el estado de los lípidos, promoviendo su oxidación.

Se encuentran numerosos artículos en los que varios autores han reportado que se logra una mejor extracción de los lípidos con la técnica de Bligh y Dyer que con la técnica de Goldfisch.^{70, 75, 81} Es por esto que se ha preferido la técnica de Bligh y Dyer en la que su puede usar la muestra húmeda y la extracción se realiza en frío.

Para determinar cual era el disolvente o mezclas de disolventes que iban a usar, se trabajó con carne molida de cerdo comercial y carne de pollo molida, se usaron éter de petróleo, éter etílico y la mezcla diclorometano-metanol con el fin de contar con disolventes de baja, intermedia y alta polaridad.

Se buscó el disolvente que ofreciera un mejor rendimiento y precisión en la cuantificación de lípidos, así como también conocer la influencia de los disolventes en los índices de oxidación.

3.1. VALIDACION DE LOS METODOS Y SELECCION DE LOS DISOLVENTES

3.1.1. TRABAJO PRELIMINAR

PRIMERA ETAPA.

3.1.1.1. Selección del disolvente

Se realizaron extracciones de la grasa en ambos tipos de carne con tres disolventes: éter etílico, éter de petróleo y diclorometano-metanol con el fin de precisar el disolvente que se iba a emplear en este estudio para ambos tipos de carne. Se usó la técnica de Bligh y Dyer.

Se usó carne molida de cerdo comercial, se realizaron cinco repeticiones para cada disolvente y cada una por duplicado. En la tabla 4 se presentan los resultados.

TABLA 4. Extracción de grasa para carne de cerdo molida comercial.

SOLVENTE	g Grasa/100g Muestra
ETER PETROLEO a	9.27 ± 0.73
ETER ETILICO b	12.38 ± 0.74
DICLOROMETANO/METANOL c	13.41 ± 0.39

Cada letra corresponde a un grupo de acuerdo a la prueba de Duncan.

Se procedió a hacer un análisis de varianza con los datos obtenidos, considerando los diseños estadísticos recomendados para este tipo de experimento; se obtuvieron los siguientes resultados.

La mezcla diclorometano-metanol fue la que presentó mayor rendimiento, mientras que el éter de petróleo realiza la extracción más pobre y el éter etílico realiza una extracción intermedia. La validez estadística de los datos se corroboró con la prueba de Duncan, que nos ayuda a definir la distribución de los resultados.

De este trabajo se observa que con la mezcla de disolventes diclorometano:metanol se obtiene un mayor rendimiento en la extracción que con los éteres solos. Como se menciona anteriormente la concentración de fosfolípidos es mayor en el tejido muscular que en el tejido adiposo; conociendo que el músculo de cerdo contiene de 0.7 a 0.9%³ de fosfolípidos explica porque los disolventes menos polares como el éter de petróleo, en este caso, y el éter etílico de polaridad intermedia extrajeron menor proporción de lípidos, extrayendo la fracción lipídica neutra (triglicéridos), principalmente.⁶³

La mezcla diclorometano-metanol además de ésta fracción, también extrae la fracción lipídica polar contenida en la carne de cerdo. Se debe indicar también que el alcohol además de extraer la fracción polar, produce la liberación de los lípidos asociados a proteínas en la matriz alimenticia.³⁷

Para el caso del pollo, se usó la carne de pollo completo, la cual se molió incluyendo la piel. La técnica de extracción fue la de Bligh y Dyer y se emplearon los tres disolventes anteriormente citados; se realizaron cinco repeticiones por duplicado para cada caso y los resultados que se obtuvieron se presentan en la Tabla 5.

TABLA 5.Extracción de grasa para carne de pollo.

SOLVENTES	g Grasa/100g Muestra
ETER DE PETROLEO a	7.03 ±0.51
ETER ETILICO b	11.04 ±0.47
DICLOROMETANO/METANOL b	11.41 ±0.60

Cada letra corresponde a un grupo de acuerdo a la prueba de Duncan.

Al igual que en el caso anterior se realizó el análisis estadístico y se obtuvo lo siguiente: la mezcla diclorometano-metanol logra extraer $11.41\% \pm 0.60$; y el éter etílico $11.04\% \pm 0.47$ dando valores muy cercanos, por lo que en la prueba de Duncan se colocaron en el mismo grupo, y éter de petróleo en un grupo diferente con un valor de $7.03\% \pm 0.5$ siendo la extracción más baja.

Al usar como muestra el pollo completo, incluye la grasa extra muscular, por lo que no existe diferencia significativa entre el porcentaje extraído con éter etílico y la mezcla de disolventes, aunque la proporción de lípidos insaturados es 67.3%, por lo tanto debe contener mayor cantidad de fosfolípidos, es decir, lípidos de carácter polar.

Como en el caso anterior la cantidad de lípidos que se extrae dependerá del sistema de disolventes usados, que a su vez refleja la composición del material extraído.

Se debe tener en cuenta que durante el tiempo de monitoreo los productos de oxidación formados como los peróxidos por ejemplo, son de carácter ligeramente, polar, por lo cual se requiere el uso de la mezcla de disolventes para contar con un intervalo de diferentes polaridades.

3.1.1.2.-Optimización del proceso de extracción.

Se procedió a determinar si el tiempo de maceración de las carnes con el sistema de disolventes seleccionados, diclorometano-metanol, era el óptimo para la extracción de la fracción lipídica total contenida en la muestra.

Se empleó nuevamente carne de cerdo molida comercial, se realizaron determinaciones en seis tiempos diferentes y se hicieron cuatro repeticiones para los diferentes tiempos de maceración.

Los resultados se aprecian en la Tabla 6.

TABLA 6.Extracción de grasa para carne de cerdo (g grasa/100 muestra)

TIEMPO DE MACERACION					
10 min	30 min	60 min	90 min	120 min	150 min
6.57 ± 0.24	7.97 ± 0.40	8.26 ± 0.21	8.47 ± 0.20	9.02 ± 0.25	9.07 ± 0.17

Del análisis de varianza realizado se concluyó que luego de los 60min extracciones a tiempos mayores no tienen diferencia significativa, por lo que se puede usar este tiempo como óptimo para la extracción de la grasa.

En el caso de pollo nuevamente se usó el pollo completo incluyendo la piel, así mismo se realizaron cinco repeticiones para cinco tiempos diferentes, esto se observa en la tabla 7.

TABLA 7.Extracción de grasa para carne de pollo (g grasa/100 muestra)

TIEMPO DE MACERACION				
10 min	30 min	60 min	90 min	120 min
7.09 ± 0.06	8.32 ± 0.31	9.39 ± 0.27	9.74 ± 0.17	9.82 ± 0.11

Se observa que el tiempo óptimo de maceración es de 60min, ya que a los 90 y 120min no existe diferencia significativa en la cantidad de lípidos totales extraídos.

Por lo tanto para ambas muestras el tiempo necesario de maceración de la carne con el sistema de disolventes es de 60min, con el que se obtuvo un mejor rendimiento .

3.1.1.3. Determinación del efecto del disolvente usado para la medición de peróxidos en grasa de cerdo y pollo.

Para la determinación del efecto del disolvente en la cuantificación de peróxidos se emplearon los disolventes usados anteriormente y el método de extracción utilizado fue el de Bligh y Dyer. Luego se realizó el estudio de la influencia de estos disolventes en los índices de oxidación.

Las técnicas de cuantificación de peróxidos empleadas fueron la volumétrica que es la oficial (AOAC),³⁶ y la colorimétrica, ambas descritas en el capítulo anterior.

Se siguió trabajando con el mismo tipo de muestra y se realizaron cinco determinaciones por duplicado para cada método y con los diferentes sistemas de disolventes.

En el caso de la carne de cerdo se obtuvieron los resultados de la tabla 8.

TABLA 8. Comparación de métodos para cuantificación de peróxidos en carne de cerdo

SOLVENTE	CONTENIDO DE PEROXIDOS meq/kg grasa	
	M. Volumétrico	M. Colorimétrico
ETER DE PETROLEO	0.07 ± 0.01	0.15 ± 0.01
DICLOROMETANO/METANOL	0.15 ± 0.01	0.37 ± 0.03

Se realizó el análisis estadístico de los resultados utilizando el diseño de Cuadrado Latino, que nos permitirá una mejor interpretación de los resultados:

Existe diferencia altamente significativa para los disolventes usados, obteniéndose una mejor extracción de peróxidos (por su carácter ligeramente polar), con la mezcla diclorometano-metanol que al encontrado para el éter de petróleo.

El análisis estadístico demostró que entre los métodos para determinar Índice de peróxidos el método de la AOAC y el colorimétrico existe diferencia altamente significativa.

Los valores obtenidos son más elevados en el método colorimétrico, probablemente debido a la mayor sensibilidad de esta prueba y a la estequiometría de la reacción. aunque los valores para el método colorimétrico son mucho más elevados, probablemente por la mayor sensibilidad de esta prueba, así como a la estequiometría de la reacción. Se propone una estequiometría diferente, pues mientras que en el método volumétrico transfiere dos electrones por cada peróxido en la técnica colorimétrica se transfieren aproximadamente cuatro.

Para el caso del pollo los resultados obtenidos se observan en la tabla 9.

TABLA 9. Comparación de métodos para cuantificación de peróxidos en carne de pollo.

SOLVENTE	CONTENIDO DE PEROXIDOS meq/kg grasa	
	M. Volumétrico	M. Colorimétrico
ETER DE PETROLEO a	0.019 ± 0.002	0.029 ± 0.004
ETER ETILICO b	0.031 ± 0.004	0.106 ± 0.01
DICLOROMETANO/METANOL c	0.060 ± 0.007	0.245 ± 0.04

Del análisis estadístico de los resultados tenemos que:

Existe diferencia altamente significativa en el tipo de disolvente usado. En la prueba de Duncan separa cada disolvente o mezcla de disolventes en diferentes grupos, se observa que la mezcla diclorometano-metanol permite la extracción de mayor cantidad de peróxidos, mientras que el éter de petróleo da la extracción más baja.

Estos resultados indican que la mezcla de disolventes no solo realiza una mejor extracción del material lipídico sino que también extrae con mayor eficiencia los productos de oxidación.

En cuanto a los métodos utilizados para la evaluación de índice de peróxidos, tenemos que el método colorimétrico presenta valores superiores al método volumétrico, existiendo diferencia altamente significativa entre éstos, por las mismas razones expuestas que en el caso anterior.

3.2.ALMACENAMIENTO Y MONITOREO DE LA OXIDACION DE LIPIDOS EN CARNE DE CERDO Y POLLO ALMACENADAS EN CONGELACION A -18°C.

De los resultados obtenidos en la etapa anterior, la mezcla de disolventes que se empleó para la extracción de los lípidos totales y sus productos de oxidación fue la mezcla diclorometano-metanol y el método de extracción, el de Bligh y Dyer modificado para ambos casos: carne de cerdo (chuleta) y pollo entero.

A continuación se presentarán las tablas y gráficas de los resultados obtenidos durante la evolución de la oxidación de la grasa para los productos alimenticios objetos de este trabajo.

3.2.1. MUESTRA DE CARNE DE CERDO (CHULETA)

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. Tanto en las tabla 9 de resultados como en las gráficas 1 y 2, podemos observar los siguientes resultados:

Los peróxidos en ambos métodos utilizados siguen el comportamiento normal de estos compuestos a lo largo del tiempo, van en aumento hasta los 320 días en donde llegan a un punto máximo y posteriormente disminuyen.

La grasa no se encuentra distribuida uniformemente en la chuleta, existen regiones en las cuales hay un mayor acumulación de tejido adiposo, acelerándose aquí la oxidación de las grasas, ya que tanto las paredes celulares como el interior de la células del tejido adiposo son ricas en fosfolípidos, los cuales contienen ácidos grasos altamente insaturados muy susceptibles a la oxidación. Esto explica porque aunque el balance grasa-productos de oxidación indica que todavía hay grasa disponible, posiblemente en determinadas regiones, donde el contenido de grasa es menor así como el acceso del oxígeno es más difícil, el proceso de oxidación se observa más lento. Por lo tanto, esta medida promedio de los peróxidos indicaría que estos van en decremento. Este comportamiento se debe a que la velocidad de degradación de peróxidos es menor a la de formación en estas regiones.

El valor máximo de peróxidos fue de 27.63 meq/kg de grasa para el método colorimétrico, y de 10.49 meq/kg de grasa para el método volumétrico. Ambos valores sobrepasan al valor de 10 meq/kg de grasa que se da para manteca de cerdo.⁶⁶ Valores mayores presentan aromas y sabores rancios. Para la interpretación de los resultados se debe tomar en cuenta la composición lipídica del material que se está analizando,⁶⁷ que para el caso del cerdo contiene un alto porcentaje de lípidos poliinsaturados lo que favorece el proceso de oxidación.

Los hidroperóxidos presentes pueden interactuar con las proteínas y los aminoácidos causando cambios en las propiedades funcionales y estructurales de las proteínas además de la degradación de algunos aminoácidos disminuyendo el valor nutritivo de la carne. Como ejemplo se puede mencionar la oxidación de los residuos de cisteína para formar derivados de los ácidos sulfinicos y sulfónicos; por otro lado los residuos de cisteína en las proteínas producen mono, di, tri y tetrasulfóxidos cuando están sometidos a oxidación lo que disminuye su disponibilidad.

Las vitaminas D, E y B₂ son reducidas durante la oxidación de los lípidos siendo los primeros nutrimentos que se pierden en la matriz alimenticia. De estas, la riboflavina presente además de ser oxidada, favorece la oxidación de aminoácidos como la histidina, cisteína, metionina, triptofano y tirosina en presencia de hidroperóxidos.

El Índice de Kreis (gráfica 3), es la medida de los productos secundarios de la oxidación de los lípidos, en las primeras mediciones al inicio del almacenamiento presentan valores negativos hasta el día 77, a partir del cual, va incrementándose su valor manteniendo esta tendencia hasta el final de los monitoreos, como se observa en la gráfica 3. Este método nos permite observar como se incrementan los productos aldehídos a mayor velocidad a medida que los peróxidos se van aproximando a su punto máximo. Las especificaciones para la prueba de índice de Kreis indica que un producto se debe considerar como rancio cuando esta prueba es positiva. Sin embargo, el valor obtenido el día 77 es de 0.027 D.O. por gramo de grasa, siendo un valor tan bajo que nos indica un enranciamiento incipiente de la chuleta.

El Índice de TBA (gráfica 4), que cuantifica el malonaldehído presente, también producto secundario de oxidación y determinante en el olor y sabor a rancio en los alimentos que contienen lípidos oxidados; comienza a incrementar su valor a partir del día 136 lentamente hasta el día 215, luego del cual comienza a disminuir lentamente hasta el día 284, en donde nuevamente se observa que van en aumento.

Rhee⁶ en su trabajo realizado en carne de cerdo y pollo encuentra el mismo comportamiento que el obtenido en este trabajo para la molécula de malonaldehído, obteniendo el máximo valor a los 75 días, luego del cual disminuye hacia el día 150. Como no se continuo con estas mediciones se podría especular que nuevamente la cantidad de malonaldehído iría en ascenso ya que para este tiempo de almacenamiento en congelación aun existe una gran proporción de la grasa que no ha sido oxidada tanto en la carne de cerdo como en la de pollo. La misma situación se presenta en el trabajo realizado por Donoso⁶¹ para carne de res, en el cual el período de almacenamiento es mas prolongado. Por consiguiente, se encuentra que a los 82 días de almacenamiento el valor del malonaldehído es de 2.31 mg MAD/kg de muestra, disminuyendo a 1.7 mg MAD/kg de muestra a los 169 días, aumentando nuevamente para el día 319. Esta misma conducta del malonaldehído se encuentra en un trabajo realizado en trucha.⁶⁹

Este comportamiento se debe probablemente a que la velocidad de descomposición de los peróxidos no fue lo suficientemente rápida para mantener el mismo ritmo de producción de malonaldehído, pero como todavía los peróxidos no habían llegado a su valor máximo se ve que nuevamente aumenta la producción de malonaldehído, a medida que siguen incrementándose los peróxidos manteniéndose su producción hasta el final de los monitoreos.

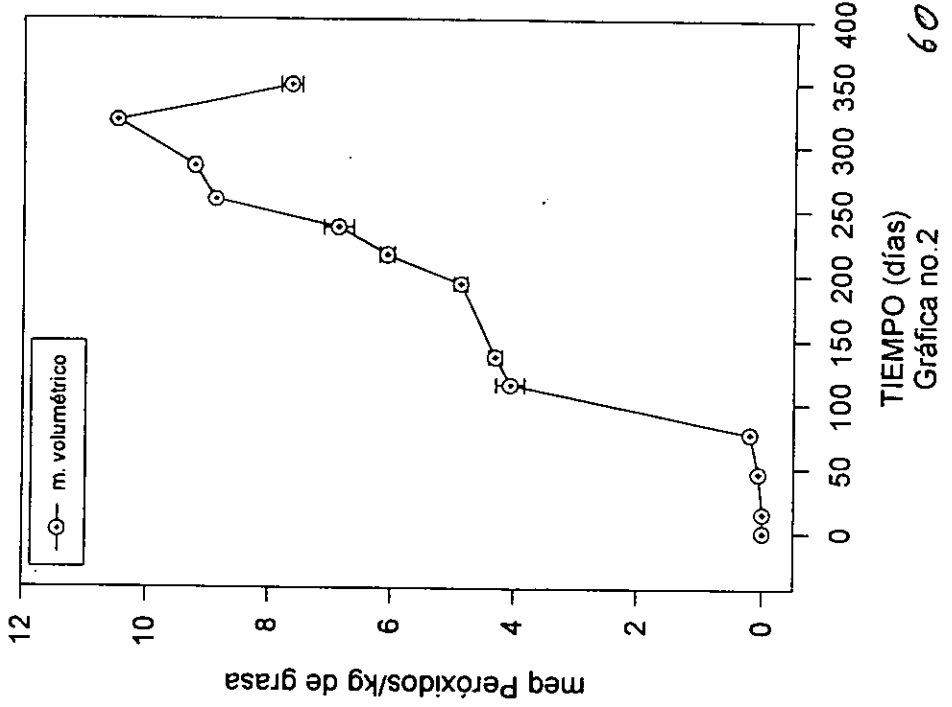
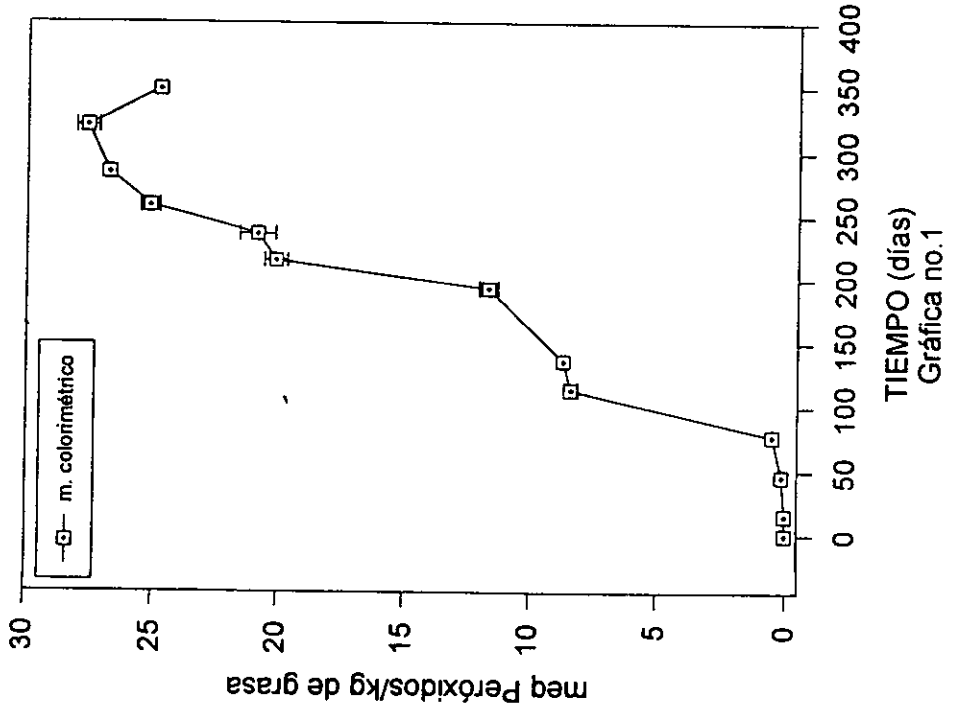
Es posible que durante el tiempo en el cual disminuyó el malonaldehído estuvo interaccionando con otras moléculas de la matriz alimenticia, como por ejemplo, aminoácidos libres o proteínas, ya que se trata de una especie química muy reactiva,⁶⁷ trayendo como consecuencia además de la aparición de olores desagradables aún en muy bajas concentraciones, así como la formación de polímeros que dañan la textura del alimento y al mismo tiempo disminuyen su valor nutritivo debido a la pérdida de aminoácidos, principalmente en la cadena lateral de la lisina que se encuentre en forma libre, la cual pudo liberarse de las proteínas por efecto de la congelación haciéndola capaz de reaccionar con los lípidos peroxidados.

Tabla 10. Resultados de las pruebas de oxidación de lípidos en carne de cerdo (chuleta) almacenada en congelación a -18°C.

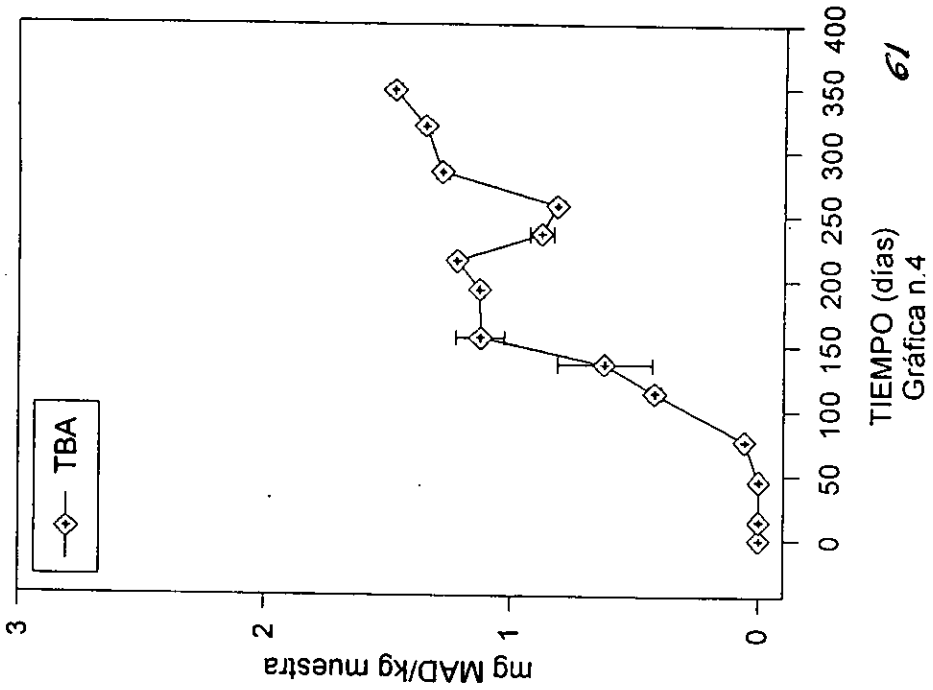
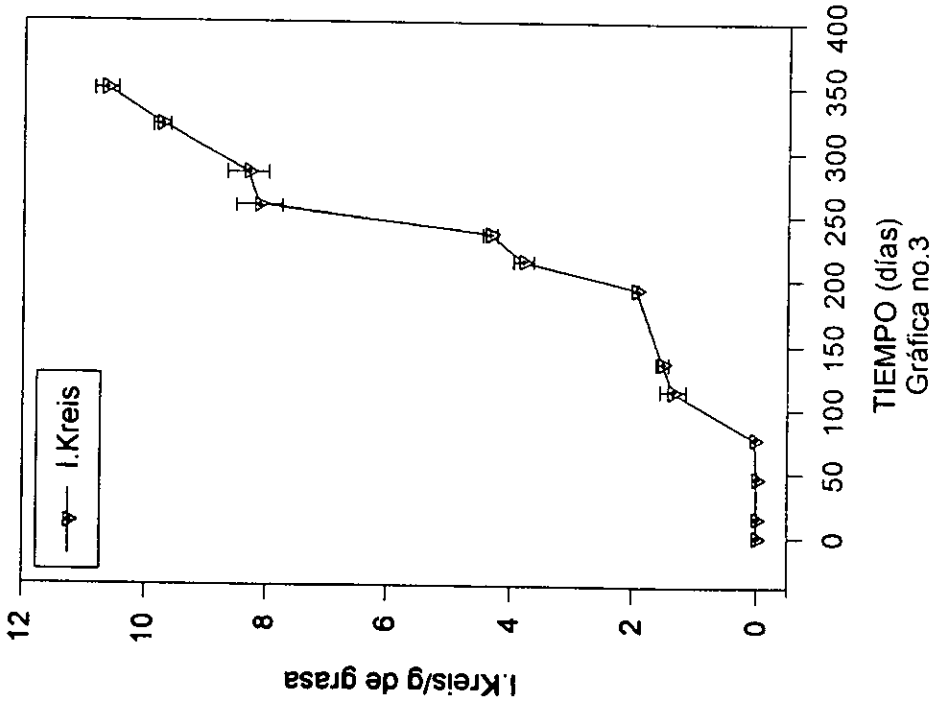
TIEMPO (días)	Grasa	Índice de peróxido		TBA	I.Kreis.
	g/100 g muestra	meq/kg de grasa		mg MAD/kg muestra	en gramo de grasa
		Método Colorimétrico	Método Volumétrico		
0	13.37	0	0	0	0
15	12.83	0	0	0	0
46	12.94	0.10±0.004	0.06±0	0	0
77	12.63	0.48±0.03	0.20±0	0.058±0.002	0.027±0
114	13.69	8.36±0.27	4.06±0.23	0.41±0.02	1.34±0.20
136	13.34	8.57±0.17	4.31±0.10	0.49±0.01	1.51±0.09
193	13.59	11.64±0.30	4.88±0.09	1.13±0.01	1.94±0.02
215	13.12	20.16±0.03	6.08±0.09	1.22±0.01	3.79±0.13
236	13.59	20.88±0.72	6.87±0.23	0.87±0.05	4.34±0.11
258	13.10	25.16±0.36	8.69±0.34	0.80±0.01	8.14±0.31
284	13.26	26.78±0.07	9.24±0.06	1.28±0.02	8.33±0.03
320	12.21	27.63±0.44	10.49±0	1.34±0.02	9.75±0.14
348	14.56	24.79±0.19	7.49±0.17	1.46±0.02	10.65±0.20

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

Oxidación de lípidos en carne de cerdo



Oxidación de lípidos en carne de cerdo



3.2.2. CARNE DE POLLO

En la tabla 11 se presentan los resultados de las pruebas realizadas para este producto.

Ambos métodos de cuantificación de peróxidos presentan el mismo comportamiento, que en la carne de cerdo.

El período de inducción es muy lento, a partir del monitoreo del día 215 los valores comienzan a aumentar rápidamente, el valor máximo de peróxidos se obtiene cuando han transcurrido 258 días; en los monitoreos posteriores se ve como va en disminución. (gráficas 5 y 6).

Pese a que el contenido de lípidos insaturados en el pollo es mayor (67.3%),⁸ que en la carne de cerdo (58.5%),⁸ en los resultados obtenidos se observa que la formación de peróxidos tiene valores más elevados en la muestra de cerdo que en el pollo en el mismo tiempo; esto podría ser causado por el mayor contenido de hierro en la carne de cerdo que aceleraría la producción de peróxidos por un lado, también se debe hacer notar que al almacenarse el pollo con su piel, esta actúa como una barrera dificultando el paso del oxígeno, por lo tanto retardando la autooxidación.

Durante el período de inducción la vitamina E presente actúa como antioxidante y es rápidamente consumida. Así también la vitamina D es reducida durante la oxidación de los lípidos, siendo los primeros nutrimentos que se pierden de en la matriz alimenticia; apreciándose mejor este efecto más importante en el caso de pollo.

En la gráfica 7 se observa el comportamiento del índice de TBA que al igual que en el caso de la carne de cerdo en los primeros meses no existe moléculas de

malonaldehído, para luego observar que van aumentando paulatinamente antes de comenzar una etapa en la cual se mantienen constantes.

El malonaldehído es producido principalmente por el ácido linolénico, como este ácido graso posee 3 insaturaciones se oxida muy fácilmente, lo que explica porque el malonaldehído es detectado cuando el enranciamiento es incipiente y el contenido de peróxidos no es elevado.

Un contenido semejante de malonaldehído reportó Rhee⁶ en pechuga y muslo de pollo almacenados a -20°C, temperatura similar a la utilizada para este estudio. El tiempo de almacenamiento fue de 150 días, por lo que se podría especular que luego de este período el malonaldehído podría tener la misma conducta que la encontrada para este mismo tipo de matriz en este trabajo. Considerando que pequeñas diferencias podrían darse en la oxidación de la grasa de pollo por la diferencia de peso, edad y tipo de alimentación a la que fue sometido el animal.

Si comparamos la muestra de pollo con la muestra de chuleta de cerdo podemos observar que los valores de malonaldehído alcanzados para el pollo son ligeramente mayores, nuevamente se debería a la diferencia de composición de la grasa, que como se mencionó anteriormente el porcentaje de lípidos poliinsaturados en el pollo es mayor (4-23%)³, en comparación con el contenido en el cerdo (3-18%)³; principales promotores en la formación de malonaldehído.

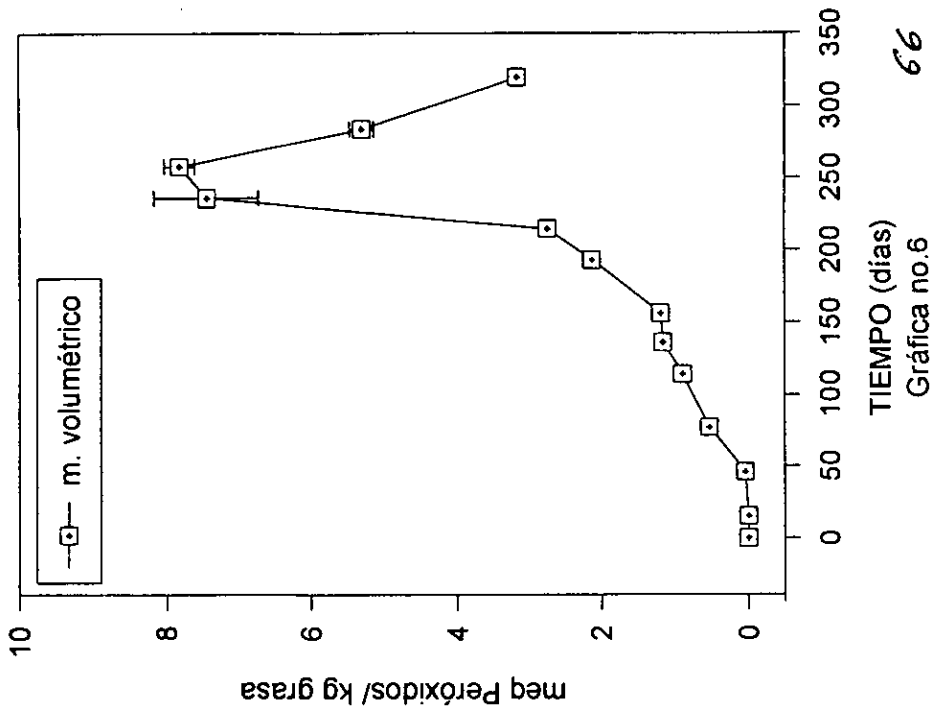
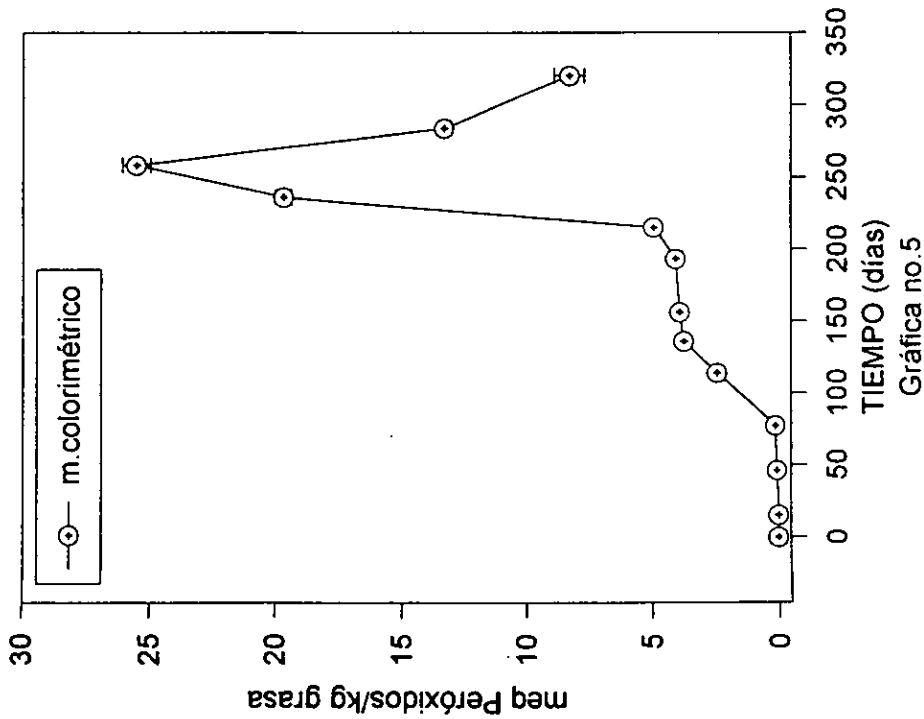
Se ha identificado la presencia de inositol, glucosa, manosa, fructosa, ribosa, ribulosa, arabinosa y xilosa en el músculo de pollo;⁸⁸ varias de estas sustancias podrían reaccionar con el TBA,^{50, 54, 55} lo cual traería como consecuencia la sobreestimación del contenido de malonaldehído.

Los valores del índice de Kreis (gráfica 8) van en aumento a partir del día 77; su incremento es lento hasta el día 236 donde su aumento se vuelve más rápido y conserva esta tendencia hasta el último monitoreo. Se puede observar además que el disparo en los valores del índice de Kreis coincide con el aumento en la velocidad de formación de peróxidos.

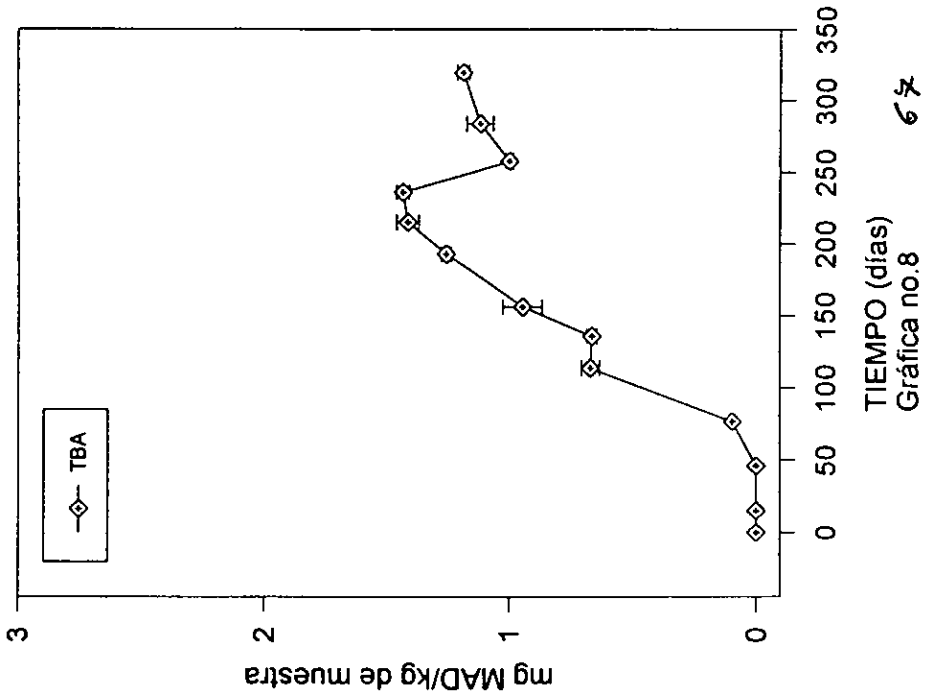
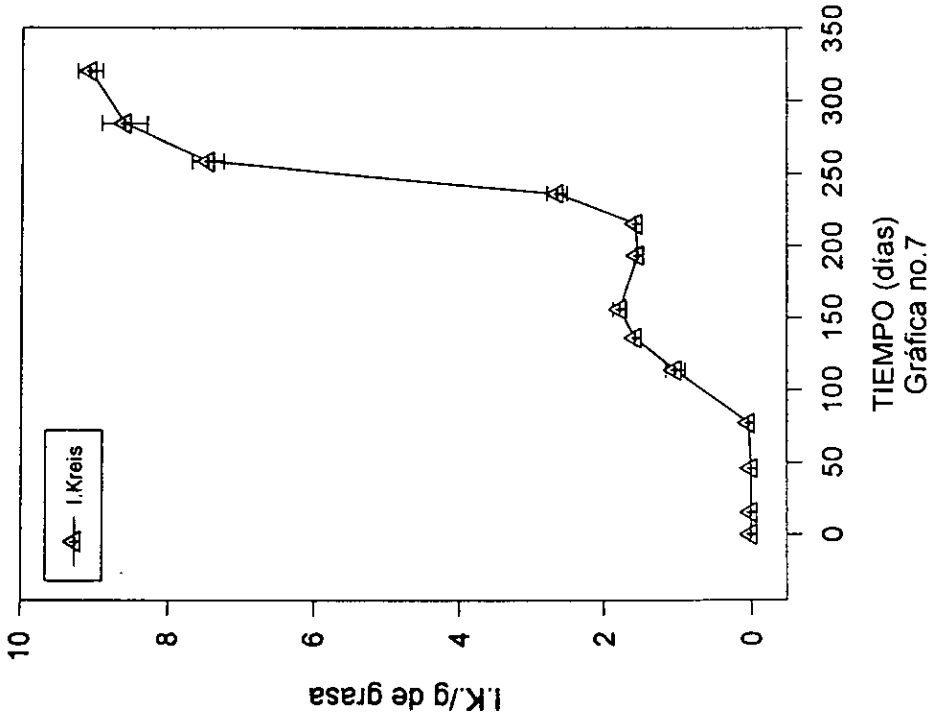
Tabla.11 Resultados de las pruebas de oxidación de lípidos en carne de pollo almacenada en congelación a -18°C.

TIEMPO (días)	GRASA	Indice de peróxido		TBA	I.K.
	g/100g muestra	meq/kg de grasa		mg MAD/kg muestra	en gramo de grasa
		M. Colorimétrico	M. Volumétrico		
0	12.00	0	0	0	0
15	12.78	0	0	0	0
46	12.56	0.07±0.005	0.04 ± 0	0	0
77	11.78	0.12 ±0.002	0.53 ±0.05	0.09 ±0.05	0.03 ±0.001
114	12.30	2.45 ±0.13	0.89 ±0.04	0.66 ±0.03	1.03 ±0.12
136	11.09	3.74 ±0.08	1.16 ±0.08	0.65 ±0.02	1.55 ±0.01
156	11.65	3.92 ±0.10	1.19 ±0.04	0.94 ±0.06	1.78 ±0.07
193	12.26	4.07 ±0.22	2.12 ±0.02	1.25 ± 0.01	1.54 ±0.02
215	12.97	4.92 ±0.04	2.73 ±0.03	1.41 ±0.03	1.56 ±0.008
236	11.54	19.67 ±0.32	7.45 ±0.71	1.43 ±0.02	2.64 ±0.11
258	12.63	25.37 ±0.48	7.82 ±0.16	0.99 ±0.01	7.46 ±0.17
284	10.46	13.30 ±0.24	5.30 ±0.16	1.11 ±0.05	8.60 ±0.30
320	10.06	8.25 ±0.59	3.15 ±0.07	1.18 ±0.02	9.07 ±0.17

Oxidación de lípidos en carne de pollo



Oxidación de lípidos en carne de pollo



CONCLUSIONES.

Tanto para la carne de cerdo (chuleta), como para el pollo completo, se obtiene un mejor rendimiento en la extracción de lípidos totales utilizando la mezcla de disolventes, diclorometano-metanol (1:1). Esto se justifica por la composición de ambos tipos de carne, que aunque difieren entre sí, contienen además de lípidos neutros (triglicéridos), lípidos con carácter polar como fosfolípidos y colesterol; así como cantidades importantes de lípidos unidos.

Los índices de oxidación, para los dos tipos de muestra, en ambas técnicas presentan valores superiores cuando la extracción se realiza con la mezcla diclorometano-metanol (1:1), indicando que además de realizar una mejor extracción de la grasa, también se obtiene una mejor extracción de los productos de oxidación, por su carácter ligeramente polar.

Se puede recomendar la mezcla diclorometano-metanol (1:1) tanto para la cuantificación de la grasa como para la determinación del estado de rancidez de un producto mediante las diferentes técnicas anteriormente citadas.

Para la carne de cerdo almacenada en congelación a -18°C el valor de peróxidos sale de especificación a los 193 días, la norma permite para aceites puros y mantecas como valor límite 10meq/kg de grasa, mientras que para la carne de pollo se sobrepasa este valor a los 236 días. La cuantificación de los peróxidos es una prueba útil para el seguimiento del proceso de oxidación, partiendo de una muestra fresca.

El comportamiento de la molécula de malonaldehído medido a través del índice de TBA es muy variable, por lo que no debe ser aplicada como única prueba analítica para conocer el estado de rancidez de productos carnicos.

En los métodos oficiales el índice de Kreis se realiza de manera cualitativa, cuando es positivo indica rancidez de la grasa y el producto es desechado, por lo tanto en los productos estudiados, a partir del día 77 en ambos casos ya están fuera de la norma.

La muestra de cerdo comienza su proceso de oxidación en menor tiempo que la de pollo, probablemente porque la piel de pollo sirve de barrera para el paso de oxígeno retardando su oxidación, aunque el contenido de lípidos insaturados es mayor en el pollo que en el cerdo.

Las técnicas empleadas en este trabajo fueron las adecuadas; presentaron repetibilidad y reproducibilidad.

De los resultados obtenidos se puede concluir que la congelación es una técnica de conservación que no afecta de manera significativa la oxidación de los lípidos en períodos de almacenamiento menores a 77 días, por lo tanto estos productos se deben consumir antes de este período donde comienza a acelerarse su deterioro.

Se concluye que se deben emplear por lo menos dos métodos con el fin de determinar las diferentes etapas del proceso de oxidación, para contar con una información completa del estado de enranciamiento que presentan las muestras.

BIBLIOGRAFIA

1. - Freeman, D. y Hearnberger, J: 1994. "Rancidity in selected sites of frozen catfish fillets". J. Food Sci. 59, 60-63.
2. - Watt, B.K. y Merrill, A.I.1975. "Composition of foods." Agriculture Handbook no.8, Department of agriculture, Washinton, D.C. AOAC, 1990. "Official Methods of Analysis, 15th. Ed". Association of Official Analytical Chemists, Inc. Arlington, VA. USA.
3. - Fennema, R.Owen. 1993. "Química de los alimentos". Editorial Acribia, S.A. México.
4. - Carpenter, A., Bray, R., Briskey, E. y Traeder, D. 1961. " Intramuscular fat distribution in the *Longissimus dorsi* of paired pork loins". J. A. S. 603-605.
5. - Chan, H. 1987. "Autoxidation of Unsaturated Lipids". Academic Press Inc. Orlando, USA.
6. - Rhhe, K., Anderson, L. y Sams, A. 1996. " Lipid oxidation potential of beef, chicken, and pork". J.Food. Sci. 61, (1), 8-12.
7. - Iturbe, Ch., F. y Valdivia, M. de los Angeles .1996 " Análisis fisicoquímico de alimentos" Departamento de Alimentos y Biotecnología, Fac. de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.
8. - Bower, J. 1992. "Food theory and aplicaciones". Editorial Macmillan, Inc. 2da. Edición.

9. - Gunstone, F., D. 1993. "Information on the composition of fats from their high-resolution ^{13}C nuclear magnetic resonance spectra". J.A.O.C.S. 70, (4). 361-366.
- 10.- Oteiza, P., 1994. "A mechanism for the stimulatory effect of aluminum on iron - induced lipid peroxidation". Biochem. Biophys. 308, (2), 374-379.
- 11.- Madhavi, D., Deshpande, S. y Salunkhe.1996. "Food antioxidants. technological, toxicological, and health perspectives". Ed. Marcel Dekker, Inc.
- 12.- Eun, J., Hearnberger, J. y Kim, J. 1993. "Antioxidants, activators, and inhibitors affect the enzymic lipid peroxidation system of catfish muscle microsomes". J. Food Sci. 58, 1, 71-74. Ajayan, A., Fenton, T., Hardin, R. y Sim, J. 1993. "Measuring lipid oxidation volatiles in meats". J.Food Sci. 58, (2), 270-273.
- 13.- Mazur, Peter. 1977. " The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates". Criobiology. 14, 251-272.
- 14.-Shenouda, Soliman. 1980. "Theories of protein denaturation durin frozen storage of fish flesh". Adv Food Res. 26, 275-306.
- 15.- Schwartzberf, H. y Hartek, R. 1992. "Physical chemestry of foods". Ed. Marcel Dekker. Inc.
- 16.- Labuza,T. 1980. "The effect of water activity on reaction kinetics of food deterioration". Food Technol. 34, (12), 36-41.
- 17.- Rochland, L. y Nishi, S. 1980. "Influence of water activity on food product quality and stability". Food Technol.34, (4), 42-51.

- 18.- Shimada, Y., Roos, Y. y Karel, M. 1991. "Oxidation of methyl linoleate encapsulated in amorphous lactose-based food model". J. Agric. Food Chem 39, (4), 637-641.
- 19.- Kowalski, E., Tauscher, B. y Ludwing, H. 1994. "Autoxidation of linolenic acid under high pressure". A. Ins. Physics. 33, 1333-1336.
- 20.- Miyazawa, T., Kashima, M. y Fujimoto, K. 1993. "Fluorometric peroxigenase assay for lipid hidroperoxides in meats and fish". J. Food Sci. 58, (1), 66-70
- 21.- Stansby M. 1990. "Fish oils and nutrition". The AVI book. Ed. Van Nostrand Reinhold. New York.
- 22.- Marshall, A., Sams, A. y Elswyk., M. 1994. "Oxidative stability and sensory quality of stores eggs from hens fed 1.5% menhaden oil". J. Food Sci. 59, (3), 561-563.
- 23.- Bruunjensen, L., Skovgaard, M., Skibsted, L. y Bertelsen, G. 1994. "Antioxidant synergism between tocopherols and ascorbyl palmitate in cooked, minced turkey". Zeitschrift fur Lebensmittel- Untersuchung und- Forschung 199, (3), 210-213.
- 24.- Wong, W.S. 1989. "Mechanism and theory in food chemistry". The AVI book. Ed. Van Nostrand Reinhold. New York.
- 25.- Miki, H., Nishimoto, J. y Yamanaka, T. 1994. "Relation between protein denaturation and lipid oxidation in fish muscle during storage at low temperatures". Nippon suisan Gakkaishi, 60, (5), 631-634.

- 26.-Ajayan, A., Fenton, T., Hardin, R y Sim, J. 1993. "Measuring lipid oxidation volatiles in meats". *J. Food Sci.* 58, (2), 270-273.
- 27.- McCord, J., 1994. "Free radicals and prooxidants in health and nutrition". *Food Technol.* 48, (5), 106-111.
- 28.- Pearson, A., Gray, J.,Wolzak, A. y Horenstein, N. 1983. "Safety implications of oxidized lipids in muscle foods". *Food Technol.* 37, (7), 121-129.
- 29.- Richard, M., Guiraud, P., Meo, J., y Favier, A. 1992. " High-performance liquid chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct in biological materials (plasma and human cells) using a commercially available reagent". *J. Chromatogr.* 577, 9-18.
- 30.- Dobarganes, C., Pérez Camino, y Gutiérrez González-Quijano, R. 1984. "Métodos analíticos de aplicación en grasas calentadas. I. Determinación de ésteres metílicos no alterados". *Grasas y Aceites.* 35, (3), 172-177.
- 31.- Hopia, A., Lampi, A., Piironen, V., Hyvönne, L. y Koivistoinen, P. 1993."Application of high-performance size - exclusion chromatography to study the autoxidation of unsaturated triacylglycerols": *J.A.O.C.S.* 70, (8), 779-784.
- 32.- Brown, P. y Kestulovic, A. 1979. "Practical aspects of reversed-phase liquid chromatography applied to biochemical and biomedical research". *Anal. Biochem.* 99, 1-21.
- 33.- O'Connor, R. 1956. "Application of infrared spectrophotometry to fatty acid derivates". *J.A.O.C.S.* 33, 1-5.

- 34.- Sato, T., Kawano, S. y Iwamoto, M. 1991. "Near infrared spectral patterns of fatty acid analysis from fats and oils". J.A.O.C.S. 68, (11), 827-833.
- 35.- Neff, W., Selke, E., Mounts, T., Rinsch, W., Frankel, E. y Zeitoun, M. 1992. "Effect of triacylglycerol composition and structures on oxidative stability of oils from selected soybean germplasm". J.A.O.C.S. 69, (2), 111-118.
- 36.- AOAC. 1990. "Official Methods of Analysis, 15th Ed. Association of Official Analytical Chemists, Inc. Arlington, VA. USA.
- 37.- Egan, H., Kirk, R. y Sawyer, R. 1988. "Análisis químico de los alimentos de Pearson". Ed. Continental. México.
- 38.- Lovaas, E. 1992. "A Sensitive Spectrophotometric Method for lipid Hydroperoxide Determination". J.A.O.C.S. 69,(8), 777-783.
- 39.- Badings, H., 1960. "Principles of autoxidation processes in lipids with special regard to the development of autoxidation off-flavors". Neth Milk Dairy J. 14. 215-242.
- 40.- Barthel, G. y Grosch. W. 1974. "Peroxide value determination-comparison of some methods". J.A.O.C.S. 51, 540-544.
- 41.- Santah, N. y Decker, E., 1994. "Rapid, sensitive, iron-based spectrophotometric methods for determination of peroxide values of food lipids". J.A.O.A.C. 77, (2), 421-424.
- 42.- Tarladgis, B., Watts, B., Younathan, M. y Dugan, L. 1960. "A distillation method for the quantitative determination of malonaldehyde in rancid foods". J.A.O.C.S. 27, 44-48.

- 43.- Ian Gray, J. y Monahan, F. 1992. "Measurement of lipid oxidation in meat and meat products". *Trends Food Sci. Technol.* 31, 315-319.
- 44.- Vandervoort, F., Ismail, A., Sedman, J. y Dubois, J. 1995. "The determination of peroxide value by Fourier transform infrared spectroscopy". *J.A.O.C.S.* 71, (9), 921-926.
- 45.- Mattahaus, B., Wiezorek, C. y Eichner, K. 1994. "Fats chemiluminescence method for detection of oxidized lipids". *Fat Sci. Technol.* 96, (3), 95-99.
- 46.- Gasparoli, A., Fedeli, E., Pizzocaro, F. y Goffrè, C. 1992. "Indagine sull'ossidabilità dei lipidi della carne di pollo". *Riv. Ital. Sostanze Grasse.* 69, 448-452.
- 47.- Park, D., Terao, J. y Matsushita, S. 1981. "High performance liquid chromatography of hidroperoxides formed by autoxidation of vegetable oils". *Agric. Biol. Chem.* 45, (11), 2443,2448.
- 48.- Viinanen, E. y Hopia, A. 1994. "Reversed-phase high-performance liquid chromatographic analysis of triacylglycerol autoxidation products with ultraviolet and evaporative light-scattering detectors". *J.A.O.C.S.* 71, (5), 537-539.
- 49.- Kaplan, E. 1985. "High - performance liquid chromatography as a tool for identification of linolenic acid hydroperoxide prepared, with soybean lipooxygenase". *J. Chromatogr.* 350, 435-443.
- 50.- Raharjo, S., Sofos, J. y Schmidt, G. 1992. "Improved speed, specificity, and limit of determination of an aqueous acid extraction thiobarbituric acid-C₁₈ method for measuring lipid peroxidation in beef". *J. Agric. Food Chem.* 40, 2182-2185.

- 51.- Uchiyama, M. y Mihara, M. 1978. " Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test ". Anal. Biochem. 86, 271-278.
- 52.- Sinnhuber, R. y Yu, T. C. 1958. "2-thiobarbituric acid method for the measurement of rancidity in fishery products. II. The quantitative determination of malonaldehyde". Food Technol. 12, (11), 9-12.
- 53.- Salih, A., Simth, D., Price, J. y Dawson, E. 1987."Modified extraction 2-thiobarbituric acid method for measuring lipid oxidation in poultry". Poultry Sci. 66, 1483-1488.
- 54.- Tsoukalas, B. y Grosch, W. 1977. " Analysis of fat deterioration-comparison of some photometric tests". J.A.O.C.S. 54, 490-493.
- 55.- Du, Z. y Bramlage, W. 1992. "Modified thiobarbituric acid assay for measuring lipid oxidation in sugar-rich plant tissue extracts". J.Agric. Food Chem. 40,1566-1570.
- 56.- Saari , A., Der Guan, M., Manwaring, J. y Addis, P. 1984. "Free malonaldehyde metermination in tissues by high-performance liquid chromatography ". Anal Biochem. 142, 277-283.
- 57.- Raharjo, S., Sofos, J. y Schmidt, G. 1993. "Solid-phase acid extraction improves thiobarbituric acid method to determine lipid oxidation". J Food Sci. 58, (4), 921-924.
- 58.- Yu, T. y Sinnhuber, R. 1967. "An improved 2-thiobarbituric acid (TBA) procedure for the measurements of autoxidation in fish oils". J.A.O.C.S. 44, 256-258.

- 59.- Botsoglou, N., Fletouris, D., Papageorgiou, G., Vssilopoulos, V., Mantis, A. y Trakatellis, A. 1995. " Rapid, sensitive, and specific thiobarbituric acid method for measuring lipid peroxidation in animal tissue, food, and feedstuff samples". J. Agric. Food Chem. 42, (9), 1931-1937.
- 60.- Bird, R., Hung, S., Hadley, M. y Draper, H. 1983. " Determination of malonaldehyde in biological materials by high-pressure liquid chromatography" Anal. Biochem. 128, 240-244.
- 61.- Aurand, L., Woods, E. y Wells, M. 1987. "Food composition and analysis". AVI book. Published By Van Nostrand Reinhhdd Company, New York 1987.
- 62.- Kirk,R., Sawyer, R. y Egan, H. 1996. "Composición y Análisis de Alimentos de Pearson". Compañía editorial Continental, S.A. de C.V. Segunda Edición. México.
- 63.- Cuesta, C., Sánchez-Muniz F., Garrido-Polonio, C., López, S. y Arroyo, R. 1993. " Thermoxidative and hidrolitic changes in sunflower oil used in fryings with a fast turnover of fresh oil". J.A.O.C.S. 70, (11), 1069-1073.
- 64.- Herslöf,B., Podlaha, O. y Töregård, B. 1979. "HPLC of triglycerides". J.A.O.C.S. 56, 864-866.
- 65.- Sánchez, F., Cuesta, C. y Garrido-Polonio. C. 1993. " Sunflower oil used for frying: combination of column, gas and high-performance size-exclusion chromatography for its evaluation". J.A.O.C.S. 70, (3), 235-240.
- 66.- Roos, M. 1977. " Pre-column derivatisation in high-performance liquid chromatography". J. Chromatogr. 141, 107-119.

- 67.- Konishi, H., Neff, W. y Mounts, T. 1993 " Correlation of reversed-phase high-performance liquid chromatography and gas-liquid chromatography for fatty acid compositions of some vegetable oils". J. Chromatogr. 629, 237-241.
- 68.- Hopia, A., Piironen, V., Koivistoinen, P: y Hyvö,L. 1992. "Analysis of lipid classes by solid-phase extraction and high-performance size-exclusion chromatography". J.A.O.C.S. 69, (8), 772-775.
- 69.- Hamilton, R., Mitchell, S. y Sewell, P. 1987. " Techniques for the detection of lipids in high-performance liquid chromatography". J. Chromatogr. 395, 33-46.
- 70.- Sahasrabudhe, M. y Smallbone, B. 1983. " Comparative evaluation of solvent extraction methods for the determination of neutral and polar lipids in beef". J.A.O.C.S. 60, 801-805.
- 71.- Hagan, S., Murphy, E. y Shelley, L: 1967. "Meat and Meat Products". J.A.O.C.S. 50, (2), 250-254.
- 72.- Erickson, M., C. 1993. "Lipid extraction from channel catfish muscle: comparison of solvent systems". J. Food Sci. 58, 1, 84-89.
- 73.- Rossell, J. y Pritchard. 1991. "Analysis of oil seeds fats and fatty food": Edit. Elsevier. New York.
- 74.- Sando, C. 1928. "Lipids and their estimation in vegetable tissues". Plant Physiol. 3, 155-184.
- 75.- Gunnlaugsdottir, H. y Axkman, R. 1993. "Three extraccion methods for determination of lipids in fish meal: evaluation of a hexane/isopropanol method as an alternative to chloroform-based methods" J. Sci Food Agric. 61, 235-240.

- 76.- Warren, M., Brown, H. y Davis, D. 1988. " Solvent extraction of lipid components from egg yolk solids ". 65, (7), 1136-1138.
- 77.- Fernandezespla, M. y , Oneill, E. 1993. " Lipid oxidation in rabbit meat under different storage conditions". J. Food Sci. 58, (6), 1262-1264.
- 78.- Nelson, G., J. 1991. "Isolation and purification of lipids from biological matrices in: analyses of fats, oil and lipoproteines".J. A. O C. S. 20-59.
- 79.- Chen, I., Shen, S. y Sheppard, A. 1981. " Comparison of methylene chloride and chloroform for the extraction of fats from food products". J.A.O.C.S. 58, 599-601.
- 80.- Khor, H., y Cha, S. 1985. "Comparative studies of three solvent mixtures for the extraction of soybean lipids". J.A.O.C.S. 62, (1), 98-99.
- 81.- Donoso, S. 1996. "Evaluación de deterioro químico en carne de res y pescado congelados". Fac. Química. Departamento de Alimentos y Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. Tesis maestría.
- 82.- Brewer, S., Ikins, W. y Harbers, C. 1992. " TBA values, sensory characteristics, and volatiles in ground pork during long-term frozen storage: effects of packaging". J. Food Sci. 57, (3), 558-563.
- 83.- Hart, L. 1991. "Análisis Moderno de los Alimentos". Ed. Acribia. México.
- 84.- Bligh, E., C. y Dyer, W. 1959. "A rapid method of total lipid extraction and purification". Can. J. Biochem. and Physiol.17, (3), 911-917.

- 85.- Ramirez, R., 1995. "Curso de estadística avanzada". Fac. Química. Departamento de Alimentos y Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México.
- 86.- FAO/OMX, 1993. "Codex Alimentarios". Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación , Organización Mundial de la Salud. Roma, Italia.
- 87.- Brewer, S. y Wu, S., 1993. "Display, packaging, and meat block location effects on color and lipid oxidation of frozen lean ground beef". J. Food Sci. 58, (6), 1219-1223.
- 88.- Mabrouk,A.F. 1964. "The kinetics of methyl linoleate emulsion autoxidation in the presence of polyhydroxy compounds". J.A.O.C.S. 41, 331-334.

APENDICE

1.- EFECTO DEL DISOLVENTE EN LA CUANTIFICACION DE LIPIDOS TOTALES

a) Carne molida de cerdo comercial.

Método de extracción: Bligh y Dyer.

Tabla A-1. Extracción de lípidos en carne de cerdo molida (g grasa/100 muestra).

Repeticiones	Eter de petróleo	Eter etílico	Diclorometano /metanol
1	9.88	12.18	13.73
2	10.07	12.01	13.97
3	8.54	12.90	13.61
4	9.05	13.22	12.71
5	8.79	11.75	13.24
6	7.76	12.37	12.81
7	9.61	12.75	13.68
8	9.40	12.63	13.29
9	9.98	12.00	13.50
10	9.62	12.03	13.62
Media	9.27	12.38	13.41
D.S.	0.73	0.74	0.39

Análisis estadístico

Tabla A-2. Diseño Aleatorio

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado Medio	F
Solvente	2	93.03	46.51	155.13**
Error	27	8.31	0.307	
Total	29	101.34		

Tabla A-3. Diseño en Bloques

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Solventes	2	93.03	46.51	150.53**
Repeticiones	4	1.19	0.29	0.96 N.S.
Error	23	7.11	0.30	
Total	29	101.34		

** Diferencia altamente significativa (0.01)

N. S. No existe diferencia significativa

Eficiencia Relativa =0.978

Prueba de Duncan

E.Petróleo

E. Etílico

DM/M

b) Pollo completo molido

Método de extracción: Bligh y Dyer.

Tabla A-4. Extracción de lípidos en pollo. (g grasa/ 100g muestra).

Repeticiones	Eter de petróleo	Eter etílico	Diclorometano /metanol
1	7.29	11.16	11.60
2	7.12	11.08	12.40
3	7.68	11.22	11.10
4	6.54	11.87	11.30
5	6.27	11.17	11.80
6	6.30	11.17	11.40
7	7.00	11.14	11.64
8	7.47	11.11	11.89
9	7.58	10.38	10.78
10	7.14	10.14	10.26
Media	7.03	11.04	11.41
D.S.	0.51	0.47	0.60

Análisis estadístico

Tabla A-5. Diseño Aleatorio

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado Medio	F
Solvente	2	117.82	58.91	207.44**
Error	27	7.66	0.28	
Total	29	125.48		

Tabla A-6. Diseño en Bloques

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Solventes	2	117.82	58.91	246.16**
Repeticiones	4	2.16	0.54	2.26 N.S.
Error	23	5.50	0.23	
total	29	125.48		

E.R. = 1.17

Prueba de Duncan

E.Petróleo

E.Efílico

DM/M

2.- OPTIMIZACION DEL TIEMPO DE MACERACION EN LA EXTRACCION DE LIPIDOS USANDO LA TECNICA DE Blich y Dyer.

a) Carne de cerdo molida comercial.

Tabla A-7. Extracción de grasa para carne de cerdo (g grasa/100 muestra).

Repeticiones	Tiempo de Maceración					
	10min	30min	60min	90min	120min	150min
1	6.23	7.83	8.10	8.20	9.10	9.10
2	6.69	8.01	8.36	8.50	9.30	8.90
3	6.79	7.56	8.53	8.70	9.00	9.30
4	6.59	8.51	8.07	8.50	8.70	9.00
Media	6.57	7.97	8.26	8.47	9.02	9.07
D.S.	0.24	0.40	0.21	0.20	0.25	0.17

Análisis estadístico.

Tabla A-8. Diseño Aleatorio

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado Medio	F
t. maceración	5	16.84	3.36	34.72**
Error	18	1.76	0.097	
Total	23	18.60		

Tabla A-9. Diseño en Bloques

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado Medio	F
t. maceración	5	16.84	3.36	33.01
Repeticiones	3	0.17	0.056	4.66
Error	15	1.54	0.102	
Total	23	18.60		

E.R. = 0.93

Prueba de Duncan.

t1 t2 t3 t4 t5 t6

b) Carne de pollo.

Tabla A-10. Extracción de grasa para carne de pollo (g grasa/100 muestra).

Repetición	Tiempo de maceración				
	10min	30min	60min	90min	120min
1	7.00	8.54	9.38	9.87	9.97
2	7.12	8.27	9.14	9.89	9.78
3	7.14	7.89	9.26	9.52	9.74
4	7.12	8.58	9.78	9.68	9.80
Media	7.09	8.32	9.39	9.74	9.82
D.S.	0.06	0.31	0.27	0.17	0.11

Análisis estadístico.

Tabla A-11. Diseño Aleatorio.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado Medio	F
t. maceración	5	21.54	5.38	179.50
Error	14	0.45	0.03	
Total	19	21.99		

Tabla A-12. Diseño en Bloques

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado Medio	F
t. maceración	4	21.54	5.38	299.16**
Repeticiones	3	0.23	0.076	4.22*
Error	12	0.22	0.018	
Total	19	21.99		

E.R. = 1.62

Prueba de Duncan.

t1 t2 t3 t4 t5

3.- EFECTO DEL DISOLVENTE USADO PARA LA CUANTIFICACION DE PEROXIDOS.

a) Grasa de cerdo

Tabla A-13. Valores de meq peróxidos/kg de grasa de cerdo

Repeticiones	DISOLVENTES			
	Eter de Petróleo		Diclorometano/Metanol	
	M.AOAC	M.Colorimétrico	M.AOAC	M. Colorimétrico
1	0.054	0.150	0.131	0.367
	0.054	0.150	0.132	0.437
2	0.081	0.167	0.154	0.318
	0.081	0.150	0.152	0.330
3	0.067	0.156	0.132	0.357
	0.082	0.141	0.151	0.387
4	0.068	0.170	0.149	0.399
	0.081	0.170	0.172	0.351
5	0.087	0.149	0.175	0.387
	0.081	0.149	0.175	0.347
Media	0.073	0.155	0.152	0.373
D.S.	0.012	0.010	0.017	0.030

* Diferencia significativa (0.05)

Análisis Estadístico

Tabla A-14. Cuadrado latino: Diseño aleatorio.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Solventes	1	0.221	0.221	130.59**
Métodos	1	0.230	0.230	135.72**
Error	37	0.062	1.69e-3	
Total	39	0.514		

Tabla A-15. Cuadrado latino: Diseño en bloques

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Solventes	1	0.221	0.221	118.4
Métodos	1	0.230	0.230	123.0
Repeticiones	4	0.001	2.5e-4	0.133
Error	33	0.061	1.86e-3	
Total	39	0.514		

E.R. = 0.9

b) Grasa de pollo

Tabla A-16. Valores de meq peróxidos/kg de grasa de pollo.

Repeticiones	DISOLVENTES					
	Eter petróleo		Eter etílico		Dicloromet./metanol	
	M.AOAC	M Colori.	M.AOAC	M Colori.	M.AOAC	M Colori.
1	0.022	0.030	0.030	0.109	0.052	0.159
	0.022	0.030	0.028	0.100	0.052	0.239
2	0.022	0.034	0.032	0.127	0.055	0.260
	0.017	0.038	0.028	0.134	0.062	0.206
3	0.019	0.033	0.036	0.089	0.066	0.288
	0.022	0.032	0.037	0.104	0.073	0.301
4	0.016	0.025	0.036	0.113	0.051	0.219
	0.017	0.033	0.036	0.112	0.059	0.217
5	0.016	0.038	0.025	0.094	0.066	0.274
	0.017	0.036	0.025	0.081	0.069	0.294
Media	0.019	0.029	0.031	0.106	0.060	0.245
D.S.	0.002	0.004	0.004	0.016	0.007	0.045

Análisis estadístico

Tabla A-17. Cuadrado latino: Diseño aleatorio.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Solventes	2	0.167	0.083	47.9**
Métodos	1	0.125	0.125	71.70**
Error	56	0.097	1.74e-3	
Total	59	0.390		

Tabla A-18. Cuadrado latino: Diseño en bloques

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Solventes	2	0.167	0.083	45.90
Métodos	1	0.125	0.125	68.69
Repeticiones	4	0.003	7.5e-4	0.41
Error	52	0.094	1.82e-3	
Total	59	0.390		

E.R. = 0.95

Prueba de Duncan

E. Petróleo

E. Etílico

DM/M