

Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias

Fecha de presentación	Octubre del 2008
Estación Experimental	Santa Catalina
Programa/Departamento	Nutrición y Calidad
Proyecto	Código: 2100058001 (1515) Título: Valorización de cultivos y materias primas, para respaldar las certificaciones de origen. Desarrollar y aplicar procesos tecnológicos y agroindustriales, a través de sistemas integrados de calidad, sanidad e inocuidad, a lo largo de la cadena agro productiva.
Resultado	Número: 1 Título: Caracterización de la calidad físico-química y funcional de las materias primas y los productos a lo largo de la cadena agroalimentaria
Actividad Título:	Número: 1 Estudio de las propiedades reológicas y funcionales del maíz nativo "racimo de uva" <i>Zea mays</i> L
Ubicación	Provincia: Pichincha Cantón: Mejía Parroquia: Cutuglagua Lugar: Estación Experimental Santa Catalina
Autor	Egda. Victoria Mayorga Gavilanes
Co-Autores	Ing. Elena Villacrés Dr. Iván Samaniego
Colaboradores	Programa de Maíz - Universidad Técnica de Ambato
Fecha Inicio	Octubre 2008
Fecha terminación	Octubre 2009
Presupuesto	\$ 1848,91
Fuente de financiamiento	Fondos Fiscales (100 %)

1.- ANTECEDENTES

El maíz constituye un alimento básico a nivel mundial, tanto para consumo humano como para la agroindustria, ocupando el tercer lugar luego del trigo y del arroz. La producción nacional anual de maíz, en condiciones normales es de 595000 TM, de este volumen, la avicultura consume el 57%, la industria de balanceados para otros animales el 6%, un 25% se exporta a Colombia, el 4% se destina a las industrias de consumo humano y el resto sirve para el autoconsumo y semilla, (CORPEI, 2007).

El consumo per-cápita en la región alta andina del Ecuador es alrededor de 14,5 kg./año, en forma de tostado, choclo, mote, harinas, coladas, maicenas, etc. Este sector de la población depende del maíz para su seguridad alimentaria por el rol que el grano cumple en la dieta, como fuente de energía, debido principalmente al contenido de almidón (alrededor del 80 % de la materia seca), (Yáñez *et al.*, 2003). Durante el tratamiento hidrotermico, el almidón muestra una serie de modificaciones que influyen sobre su estructura y cuyo conocimiento es de utilidad en el sector industrial para predecir los cambios estructurales que ocurren durante un proceso, en el cálculo de requerimientos de bombeo, para establecer las dimensiones de tuberías y válvulas, realizar mezclas y diseño de plantas de proceso. Este comportamiento específico a cada tipo de almidón es lo que se conoce como propiedades reológicas (Alvarado, 1996).

En Ecuador existe una gran diversidad genética, representada en alrededor de 29 razas, de las cuales 18 se encuentran en la sierra, son de tipo harinoso y semiduro y se distribuyen de acuerdo a las preferencias de los agricultores y consumidores; las restantes se encuentran en la región litoral y son de tipo duro cristalino. Las posibilidades de exportación se concentran solo en determinados tipos de maíz, en grano crudo (chulpi, maíz morado) o procesados en diferentes productos como mote y baby corn, (Yáñez *et al.*, 2003).

El maíz morado es una variedad que posee la coronta y los granos de color rojo morado (Ramírez *et al.*, 2005). Tiene un ingrediente natural denominado cianidina-3- β -glucosa, el cual pertenece a las denominadas antocianinas, pigmentos que dan color a las frutas y vegetales, ayudan a combatir el estrés oxidativo, las enfermedades degenerativas y a la vez brindan efectos benéficos para la salud y el bienestar. Debido a estas propiedades el maíz morado podría inscribirse en la categoría de alimento funcional, ya que sus componentes alimentarios proveen beneficios a la salud más allá de la nutrición básica (Manrique, 2000).

Las antocianinas son utilizadas en la industria alimenticia como colorantes de bebidas, jugos de frutas, dulces, confites, productos de panadería, vinos y vinagres, conservas de pescado, jarabes de frutas y sopas. A pesar de su riqueza en pigmentos, actualmente el maíz morado, se utiliza

esporádicamente en la elaboración de bebidas y preparaciones tradicionales como la chicha y la colada morada, (Callejo, 2002).

Otro componente de interés en el maíz es el aceite. En general el nutriente procedente de este grano no contiene colesterol, es rico en ácidos grasos poliinsaturados (58,7 %) y monoinsaturados (24,2 %), (Botanical, www.botanical-online.com), sin embargo se desconoce la composición particular del aceite proveniente de los tipos morados o rojos.

El conocimiento de las propiedades reológicas y funcionales del maíz morado permitirá posteriormente la selección y aplicación de tecnologías adecuadas para el desarrollo de nuevos productos.

2.- JUSTIFICACIÓN

A pesar del gran valor que presenta la especie de maíz “racimo de uva”, su presencia comercial en los mercadeos es limitada y su frecuencia de consumo ha disminuido considerablemente en la población, siendo necesario caracterizarlo para rescatar su valor nutricional, funcional y cultural, fomentar su cultivo, aliviar la situación de pobreza de los pequeños agricultores y propender a su desarrollo socioeconómico.

El problema de la baja demanda nacional de los cultivares de maíz negro, puede ser atribuido en parte, al desconocimiento de la composición química, sus propiedades nutritivas y funcionales, por lo que en esta investigación se pretende encontrar, atributos de interés para la alimentación y la salud, que contribuyan a mejorar su demanda y consumo, además de determinar las características físicas, propiedades reológicas y funcionales, de interés para la agroindustria bajo la premisa de que no se puede aprovechar un producto cuyas propiedades se desconocen.

A través de este estudio, se pretende determinar la variabilidad natural de los cultivares de maíz morado y/o negro, expresado en sus llamativos colores, sabores y texturas, en función de sus propiedades reológicas y funcionales. Lo que permitirá conocer las potenciales de esta especie para el desarrollo de nuevos productos y otras aplicaciones industriales, que a su vez posibiliten el fomento de su conservación “*in situ*” y “*ex situ*”, su valorización, la ampliación del cultivo, comercialización y consumo.

3.-OBJETIVOS

3.1.- General

- Estudiar las propiedades reológicas y funcionales del maíz nativo “racimo de uva” (*Zea mays* L.), para orientar sus usos y aplicaciones en la alimentación y la agroindustria.

3.2.-Específicos

- Evaluar las características físicas, propiedades reológicas y funcionales del almidón de cinco accesiones de la raza de maíz nativo racimo de uva.
- Determinar las propiedades químicas y nutraceuticas del aceite de cinco accesiones de esta raza de maíz.
- Predecir el contenido de polifenoles, taninos y antocianinas, en el grano de nueve accesiones de la raza racimo de uva, en base a mediciones del color.

Hipótesis nula: La raza de maíz nativo “racimo de uva”, no posee propiedades reológicas y funcionales de interés para la alimentación y la industria.

4.- MATERIALES Y MÉTODOS

4.1.-Materiales

Accesiones de la raza de maíz nativo “racimo de uva”

4.2.-Reactivos

Se describen detalladamente en la pagina 11

4.2.1.-Equipos de Laboratorio

- Centrifuga
- HPLC
- Balanza analítica
- Equipo de Soxhlet.
- Estufa
- Farinógrafo
- Extensógrafo
- Analizador Rápido de Viscosidad, RVA
- Cromatógrafo de gases
- Espectrofotómetro
- Rota vapor

5.- METODOLOGÍA

Características del Sitio Experimental

- Laboratorio de Nutrición y Calidad, INIAP, Estación Santa Catalina

Ubicación	
Provincia:	Pichincha.
Cantón:	Mejía.
Parroquia:	Cutuglagua.
Situación Geográfica	
Altitud:	3058 m
Latitud:	00°22'S.
Longitud:	78°23'O

5.1.- •Evaluación de las características físicas, propiedades reológicas y funcionales del almidón de cinco accesiones de la raza de maíz nativo racimo de uva.

Factor en estudio: Accesiones de maíz

Cuadro # 1. Tratamientos para la determinación de las propiedades reológicas del almidón de maíz morado y/o negro

Tratamientos	Descripción
T1	Almidón del ECU 1
T2	Almidón del ECU 2
T3	Almidón del ECU 3
T4	Almidón del ECU 4
T5	Almidón del ECU 5
T6	Almidón de Maíz suave (testigo 1)
T7	Almidón de Maíz duro (testigo 2)

Para el estudio de las propiedades reológicas son apropiadas las accesiones con alto contenido de almidón, para lo cual se seleccionaran las cinco accesiones con mayor contenido de almidón, en base a la caracterización bromalógica realizada por Jacho, (2008).

Unidad experimental

Estará constituida por 500 g de cada acesión

Tipo de diseño

Se aplicará un diseño de bloques completos al azar, con tres repeticiones

Análisis estadístico

Cuadro # 2. Esquema del análisis de varianza

Fuente de variación	Grados de libertad
Total	20
Tratamientos	4
Repeticiones	2
Testigo	2
Error	14

Análisis funcional

Para los tratamientos significativos se aplicará la prueba de Tukey al 5 % y se realizarán comparaciones ortogonales entre los diferentes tratamientos.

Variables y métodos de evaluación

Características Físicas

- Contenido de amilosa.
- Tamaño y apariencia de los gránulos de almidón
- Temperatura de gelatinización.

La descripción detallada de los métodos de análisis consta en el Anexo 1.

Propiedades reológicas:

- Comportamiento amilográfico
- Comportamiento farinográfico
- Comportamiento extensográfico

Los métodos detallados constan en el Anexo 2.

Propiedades funcionales:

- Poder de hinchamiento
- Índice de solubilidad
- Actividad enzimática (amilácea)

La metodología detallada consta en el Anexo 3.

Manejo específico del experimento

Del estudio realizado por Jacho, (2008), se seleccionarán cinco accesiones con mayor contenido de almidón, procediéndose a su extracción vía húmeda y secado posterior a 40°C

5.2.- Determinación de las propiedades químicas y nutraceuticas del aceite cinco accesiones de esta raza de maíz.

Factores en estudio: Accesiones de maíz

Cuadro # 3. Tratamientos para la determinación de las propiedades químicas y funcionales del aceite de maíz, raza “racimo de uva”

Tratamientos	Descripción
T1	Aceite del ECU 1
T2	Aceite del ECU 2
T3	Aceite del ECU 3
T4	Aceite del ECU 4
T5	Aceite del ECU 5
T6	Aceite de maíz amarillo (testigo 1)
T7	Aceite de soya (testigo 2)

Para la caracterización del aceite, son apropiadas las accesiones con alto contenido de grasa, para lo cual se seleccionaran aquellas con mayor contenido de este componente, en base a la caracterización bromalógica realizada por Jacho, (2008).

Unidad experimental

Estará constituida por 500 ml. de aceite de cada acesión

Tipo de diseño

Se aplicará un diseño de bloques completos al azar, con tres repeticiones

Análisis estadístico

Cuadro # 4. Esquema del análisis de varianza

Fuente de variación	Grados de libertad
Total	20
Tratamientos	4
Repeticiones	2
Testigos	2
Error	14

Análisis funcional

Para los tratamientos significativos se aplicará la prueba de Tukey al 5 % y se realizarán comparaciones ortogonales entre los diferentes tratamientos.

Variables y métodos de evaluación

Propiedades Químicas: Perfil de ácidos grasos. Estos se determinarán por cromatografía de gases. Índice de peróxidos, índice de acidez, índice de saponificación, materia insaponificable, índice de yodo (Método Wijs). La descripción detallada de los métodos de análisis consta en el Anexo 4.

Propiedades funcionales

Esteroles: Colesterol, campesterol, Stigmasterol, fucosterol, ergosterol, escualeno, β -sitosterol. Se analizarán por cromatografía de gases

Tocoferoles: (\pm) - α -, $(+)$ - γ -, δ - Tocoferol. Se determinarán por cromatografía líquida de alta resolución, HPLC.

Manejo específico del experimento

Del estudio realizado por Jacho (2008), se seleccionarán cinco accesiones con mayor contenido de grasa, La misma que será extraída con hexano "grado alimenticio", para luego ser analizada, siguiendo metodologías establecidas y estandarizadas de la AOAC, (1996).

Estos resultados se compararán con aquellos obtenidos para los aceites comerciales de soya y girasol.

5.3.- Predecir el contenido de polifenoles, taninos y antocianinas, en el grano de nueve accesiones de la raza racimo de uva, en base a mediciones del color

Factor en estudio: Accesiones de maíz

Cuadro # 5. Tratamientos para la determinación del color y componentes funcionales

Tratamientos	Descripción
T1	ECU 1
T2	ECU 2
T3	ECU 3
T4	ECU 4
T5	ECU 5
T6	ECU 6
T7	ECU 7
T8	ECU 8
T9	ECU 9

El estudio de los componentes funcionales se realizara en nueve accesiones de colores característicos agrupadas en las tonalidades: roja (3), moteados (3) y morados (3).

Unidad experimental

Estará constituida por 500 g de cada accesión

Tipo de diseño

Se aplicará un diseño de bloques completos al azar, con tres repeticiones

Análisis estadístico

Cuadro # 6. Esquema del análisis de varianza

Fuente de variación	Grados de libertad
Total	26
Tratamientos	8
Repeticiones	2
Error	18

Análisis funcional

Para los tratamientos significativos se aplicará la prueba de Tukey al 5 % y se realizarán comparaciones ortogonales entre los diferentes tratamientos.

Variables y métodos de evaluación

- Medición del color: medición de componentes en el espacio CIE L*a*b
- Contenido de polifenoles
- Contenido de taninos
- Contenido de antocianinas

Manejo específico del experimento

Las mediciones de color se realizarán en el grano entero con un colorímetro IBM, *Colortec-PCM*. La diferencia colorimétrica global de estas mediciones ΔE se utilizará para correlacionar con las determinaciones de antocianinas, taninos y polifenoles, mismos que se analizaran aplicando la metodología descrita en el Anexo 4.

6.-CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

ACTIVIDADES	Octubre	Noviembre	Diciembre	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Septiembre	Octul
1. Evaluar las características físicas, propiedades reológicas y funcionales del almidón de cinco accesiones de la raza de maíz nativo racimo de uva													
2. Determinar las propiedades Químicas y nutracéuticas del Aceite de cinco accesiones de esta raza de maíz													
3. Presidir el contenido de polifenoles, taninos y antocianinas en el grano, de nueve accesiones de la raza racimo de uva en base a mediciones del color.													
4. Tabulación y análisis de resultados													
5. Escritura y publicación de resultados													

7.-PRESUPUESTO

REACTIVOS			
	Cantidad comercio	Unidad	Costo (\$)
Etanol 95%	100	ml	35,4
Hidróxido de sodio	25	g	24,6
Ácido acético 1N	500	g	55,7
Yoduro de potasio	100	g	38,4
Yodo	50	g	26,3
Hexano	500	ml	56,6
Hidróxido de potasio en metanol 0,5 M	250	g	24,5
Ácido clorhídrico en metanol 4:1 v/v	100	ml	46
Cloroformo	500	ml	56,6
Ácido acético glacial	500	g	55,7
Tiosulfato sódico	250	g	31,7
Tetracloruro de carbono	500	ml	134,5
Dicromato potásico	25	g	24
Acido sulfúrico	100	ml	61,3
Acido acético	2,5	l	85,2
Fosfato monopotásico	500	g	53,5
Fosfato disódico	500	g	81,5
Azul de bromotimol	25	g	60,4
Ácido gálico	500	g	74
Carbonato de sodio	500	g	51
Metanol densidad 0.872 g/ml.	500	ml	19,2
Acido fosfomolibdico	500	g	316
Acido fosfórico	2,5	l	55,5
Acido tánico	250	g	29,75
n-Hexano P.A.	4	l	26
n-Hexano (HPLC)	1	l	43
γ-Tocopherol ampule	25	mg	3,8
δ-Tocopherol ampule	100	mg	0,52
Éter etílico	1	l	48,2
Cartucho para Impresora	35.00	4	140.00
CD – RW	2.50	4	10
Papel	0.03	2000	60
Publicación (Proyecto)			
Tesis	8.00		72

SUBTOTAL			1760,87
Imprevistos 5%			88,04
TOTAL			1848,91
Fuente de financiamiento	Porcentaje		Aporte
	100%		1848.91

8.-BIBLIOGRAFÍA

1. Alvarado, JD. 1996. Principios de Ingeniería Aplicados a Alimentos. Universidad Técnica de Ambato, Quito-Ecuador. Impreso por Radio comunicaciones. Editorial artes Graficas. p.180.
2. Botanical, 2007. Consultado 27 de Octubre. Disponible en <http://www.botanical-online.com>.
3. Callejo, M. J. 2002. Industrias de Cereales y derivados. Madrid-España. Editorial Mundi-Prensa libros, S.A. Imprime Iragra, S.A., Bardala. p. 18-19.
4. CORPEI, 2008. Corporación de Promoción de Exportaciones e Inversiones. Consultado 20 de Octubre. Disponible en http://www.corpei.org/FrameCenter.asp?Ln=SP&Opcion=20_00.
5. Jacho.2008.Caracterización molecular y análisis químico de 65 accesiones de maíz negro y 27 accesiones de maíz chulpi (*Zea mays*L.), colectados en la Serranía del Ecuador. En prensa.
6. Madrid, A.; Cenzano, I.; Madrid, V. 1997. Manual de Aceites y grasas comestibles. Madrid-España. Editorial Mundi-Prensa libros, S.A. Impreso en Iragra, S. A. p. 144-314.
7. Manrique, A. 2000. Maíz Morado Peruano. Impreso en Lima-Perú.. Instituto Nacional de Investigación Agraria. p. 5-6. (Serie Folleto R.I. N°04-00).
8. Morrison, W.R. and Laignelet,B. 1983. An improved colorimetric procedure for determining apparent and total amylose en cereal and other starches. *Journal of Ceral Science*, 1,p.19-35.
9. Paredes, O., Schevenin, M.L., Hernandez, D. and Carábez. A. 1989. Amaranth starch-isolation and partial characterization. *Starch/starke*,41,p.205-207.
10. Ramírez, M.; Williams, D. 2005. Guía Agro-Culinaria de Cotacachi Ecuador y Alrededores. Cali, IPGRI-Américas, FERIVA, Colombia. p. 27-28.
11. Quilca, N. 2007. Determinación de las características morfológicas, físicas, organolépticas, químicas y funcionales de ecotipos de papas nativas, para orientar sus usos futuros. En prensa.
12. Yáñez, C., Zambrano J., Caicedo, M., Sánchez, V., Heredia, J. 2003. Catálogo de Recursos Genéticos de Maíces de Altura Ecuatorianos. INIAP, Programa de Maíz. Quito-Ecuador, p. 1 y 125.

ANEXO 1

VARIABLES Y METODOS DE EVALUACIÓN

CARACTERISTICAS FISICAS

CONTENIDO DE AMILOSA Y AMILOPECTINA

Paredes, O., Schevenin, M.L., Hernández, D. and Carábez. A. 1989. and Morrison, W.R. and Laignelet, B. 1983

Principio

La fracción de amilosa tiene afinidad para formar complejos con yodo. El complejo coloreado puede ser cuantificado colorimétricamente.

Reactivos

- Etanol 95%
- Hidróxido de sodio 1N
- Hidróxido de sodio 0.09N
- Ácido acético 1N
- Yoduro de potasio
- Yodo
- Amilosa de maíz , purificada
- Amilopectina de maíz , purificada

Procedimiento

- Pesar 100 mg de muestra en balones de 100 ml
- Agregar 1 ml de etanol al 95 % agitar y añadir 9 ml de NaOH 1 N, evitando que la muestra se pegue a las paredes del balón. Permitir que la gelatinización suceda a temperatura ambiente, durante 24 horas, sin agitación.
- Aforar a 100 ml con agua destilada.
- Tomar 2.5 ml en balones volumétricos de 50 ml con 30 ml de agua.
- Colocar 0.5 ml de ácido acético 1N y 1 ml de solución de yodo al 2 %
- Agitar, aforar y dejar en reposo a temperatura ambiente, en la oscuridad por 30 min.
- Pasar la muestra a las celdas del colorímetro y leer a 620 nm.

Curva estándar

Pesar separadamente 100mg de amilosa y 100 mg de amilopectina en frascos volumétricos de 100ml, agregar 5ml de hidróxido de sodio 0.09 N.

Preparar una curva estándar se acuerdo a la siguiente tabla:

Tabla #7. Datos para la preparación de una curva estándar

% de Amilosa	Composición de la mezcla (ml)		
	Amilosa	Amilopectina	NaOH 0,09 N
0	0	9	1
10	1	8	1
20	2	7	1
25	2,5	6,5	1
30	3	6	1

Fuente: Paredes, O., Schevenin, M.L., Hernández, D. and Carábez, A. 1989. and Morrison, W.R. and Laignelet, B. 1983

Tomar 5 ml de cada concentración en balones volumétricos que contengan 50 ml de agua doblemente destilada y continuar igual que con las muestras.

Cálculos

El contenido de amilosa, se obtiene directamente de graficar los porcentajes de amilosa versus la correspondiente absorbancia

TAMAÑO Y APARIENCIA MICROSCÓPICA DE LOS GRÁNULOS DE ALMIDÓN

La forma de los almidones se determinará mediante observaciones en un microscopio Nikon HFX-DX, con magnificación 4x, 10x y 20x. El tamaño del gránulo se determinará a través de mediciones del diámetro de los ejes mayor y menores, de un promedio de 10 gránulos.

TEMPERATURA INICIAL DE GELATINIZACIÓN

Fundamento

Aunque es una prueba subjetiva, es muy sencilla y rápida. Se basa en la absorción de yodo, la formación de complejos coloreados por parte de las fracciones de la molécula de almidón y los cambios que ocurren en estos cuando los gránulos de almidón inician su proceso de gelatinización.

Materiales y Métodos

- Tubos de ensayo
- Placa de calentamiento y agitación magnética
- Magnetos
- Termómetros
- Solución saturada de yodo

Método

1. En un vaso de precipitación de 250ml preparar una suspensión de almidón al 0.5% (base seca).
2. Colocar el vaso sobre una placa eléctrica de calentamiento y agitación magnética graduada de tal forma que permita elevar la temperatura

de la suspensión a una velocidad de 1°C/min adaptándole un termómetro.

3. A partir de los 50°C y cada grado centígrado que aumente la temperatura, se toman muestras de 2 ml y se colocan en tubos de ensayo.
4. Dejar enfriar y añadir dos gotas de solución saturada de yodo, reportar como temperatura inicial de gelatinización aquella en la cual se observa un cambio de coloración, rojizo a azul verdoso.

Observaciones

La prueba es totalmente subjetiva, aunque la observación del cambio de coloración es muy clara se debe tener mucha atención en ello. La solución de yodo es muy inestable y se degrada fácilmente, por lo que se sugiere utilizar soluciones recién preparadas para evitar errores en la formación de los complejos coloreados.

ANEXO 2

PROPIEDADES REOLÓGICAS

COMPORTAMIENTO AMILOGRÁFICO

Método de Ruales y Nair (1994). (36).

Principio

Los gránulos de almidón incrementan su capacidad de absorción de agua y exudan fracciones de amilosa con el incremento de la temperatura. Estos dos fenómenos juntos elevan la viscosidad de la suspensión almidón-agua, la cual puede ser registrada instrumentalmente.

Equipo

- Viscoamilógrafo Brabender

Método

1. Preparar suspensiones de almidón al 5 % en base seca, y transferirlas al recipiente del amilógrafo.
2. La temperatura inicial será de 25° C, caso contrario, llevar la muestra a dicha temperatura.
3. Iniciar el aumento de temperatura a una velocidad de 1.5° C / min hasta alcanzar una temperatura inferior en 2° - 3° C a la temperatura de ebullición del agua.
4. Mantener la muestra a esta temperatura, durante un período de 20 minutos.
5. Enfriar la suspensión a una velocidad de 1.5° C / min., hasta 50° C, y mantener a esta temperatura por 20 minutos

COMPORTAMIENTO FARINOGRÁFICO Y EXTENSOGRÁFICO.

Farinograma

Método AACC 54-21, 1992

Principio

El método determinara la capacidad de absorción de agua, misma que guarda relación con el porcentaje de sustitución, la estabilidad de la estructura de la masa, y el grado de ablandamiento durante el amasado

Equipo

- Farinógrafo Brabender

Procedimiento

- Ajuste del equipo
- Ajustar el termostato del farinógrafo para mantener la temperatura entre $30^{\circ} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$.
- Chequear la temperatura del agua de circulación en el termorregulador.
- Asegurarse que el agua del termostato esté circulando constantemente por las mangueras.

Cálculos

$$E = UI - PI$$

Donde

E = estabilidad

PI = primera intersección

UI = ultima intersección

Extensograma

Método AACC 54-10, 1962

Principio

Se determinara las cualidades elásticas de la masa, su capacidad de estiramiento y su resistencia a la extensión en relación al porcentaje de sustitución.

Materiales y Equipos

- Farinógrafo
- Extensógrafo.

La temperatura de la mezcla para los ensayos extensográficos debe estar entre $30^{\circ} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$.

La relación de la escala del extensograma es $500 \text{ g} = 500\text{BTU}$. Otras relaciones pueden ser usadas pero deben ser especificadas.

Procedimiento

Preparación de la masa

- Realizar la curva normal farinográfica para obtener el valor de la absorción.
- Preparar en el plato del farinógrafo una pasta con 50g de harina (14% de humedad).
- Colocar la harina en el plato del farinógrafo, luego mezclar el tiempo que sea necesario para el desarrollo del farinograma, cuando el centro de la curva del farinograma se encuentre en el punto máximo, la consistencia habrá registrado 500 unidades. La correcta absorción de agua puede estar dada en una consistencia de 500 unidades como máximo. El farinograma desarrollado por la masa puede ser tomado como guía.

Preparación de muestra prueba

La mezcla está completa cuando en la escala marca $150\text{g} \pm 0.1 \text{ g}$ de pasta y se da 20 revoluciones en el extensógrafo.

Prueba peso-extensión

- Después de un tiempo de reposo de 30 min, la muestra se coloca en la balanza del extensógrafo y se ajusta la posición del lápiz en la línea cero. Chequear la escritura del lápiz. En exactamente 30 min de finalizada la operación, se empieza con el estiramiento, y se detiene cuando la muestra se rompe. El instrumento reporta la curva masa-extensión o extensograma.
- Se remueve la masa de la primera prueba, se vuelve amasar, y se considera un período de reposo de 30 min, se vuelve a estirar.
- Luego de la tercera prueba, con un poco de masa se obtiene una muestra para volver a amasarla, luego de tiempo de reposo de 30 min, se vuelve a estirar. En esta forma, la masa está sometida a pruebas de 30, 60 y 90.

Evaluación

Las tres mediciones más comunes en los gráficos masa - extensión o extensogramas son los siguientes:

- 1) Resistencia a la extensión: se obtiene la curva en unidades Brabender o en cm., también el máximo 0 a 5 cm en el gráfico en Kymograph
- 2) Extensibilidad: total de la curva en mm.
- 3) Se evalúa la resistencia máxima y se reporta en mm.

Cálculos

$$IE = R/E$$

Donde

IE= índice extensográfico
R= Resistencia a la extensión
E= Extensibilidad

ANEXO 3

PROPIEDADES FUNCIONALES

ÍNDICE DE SOLUBILIDAD Y PODER DE HINCHAMIENTO

Fundamento

Los gránulos de los almidones son insolubles en agua fría. Sin embargo, la abundancia de grupos hidroxilo en su molécula motiva la tendencia de este polisacárido a absorber agua cuando se expone a este líquido. Debido a la insolubilidad de los gránulos, solo pueden absorber una cantidad relativamente baja de agua que va acompañada de un determinado hinchamiento y un aumento en su tamaño que puede ser reversible. Cuando una suspensión acuosa de almidón se calienta, los puentes de hidrogeno intermoleculares de las zonas amorfas se rompen y los gránulos se hinchan por una absorción progresiva e irreversible de agua durante el proceso de gelatinización. En estas condiciones se favorece el hinchamiento tangencial de los gránulos, caracterizado por un aumento en su tamaño y la pérdida de la birrefringencia debido a la ruptura del arreglo radial de las fracciones de amilosa y amilopectina.

Materiales y Equipo

- Centrífuga
- Tubos de centrífuga
- Placa de agitación magnética

- Magnetos
- Baño Termostático
- Termómetro
- Estufa de convección mecánica

Método

1. En un tubo de centrifuga de 50 ml previamente tarado, preparar 40 ml de una suspensión de almidón al 1% (p/v) en base seca.
2. Introducir un agitador magnético y colocar el tubo en un baño de agua a temperatura constante (60, 70, 80, ó 90°C).
3. Al tubo se le adapta un termómetro y se proporciona agitación constante a la suspensión para mantenerla uniforme durante 30 min.
4. Transcurrido el tiempo, retirar el tubo del baño, sacar el magneto de la suspensión y secar el tubo.
5. Centrifugar a 250rpm durante 15 min en una centrífuga SOL-BAT, decantar el sobrenadante y pesar los gránulos hinchados.
6. Del sobrenadante tomar 10 ml, los cuales se colocan en una charola de aluminio previamente tarada y se secan a 120°C durante 4 horas.
7. Pasar las muestras a un desecador y pesarlas.

Cálculos

Se calcula la solubilidad y el poder de hinchamiento mediante las siguientes expresiones:

$$\% \text{ Solubilidad} = \frac{\text{Peso del almidon soluble} * 400}{\text{Peso muestra (base seca)}}$$

$$\text{Poder de Hinchamiento} = \frac{\text{Peso del sedimento}}{\text{Peso muestra (b.s)} \times (100 - \% \text{ Solubilidad})} \times 100$$

Observaciones

El control de la temperatura durante el proceso de gelatinización es fundamental para obtener resultados confiables. Se recomienda el manejo de los tubos con pinzas, procurando la mínima manipulación de los mismos, ya que estos podrían influir en los pesos reportados. La etapa de decantación debe hacerse cuidadosamente, para no eliminar gránulos hinchados.

ANEXO 4

PROPIEDADES QUÍMICAS

PERFIL DE ACIDOS GRASOS

Se implementó el método de determinación de ácidos grasos por cromatografía de gases, iniciándose con la esterificación de la grasa, el procedimiento se describe a continuación:

Materiales y equipos

- Cromatógrafo de gases equipado con un detector de ionización de llama
- Microjeringa del 10 μ l
- Columna mixta empacada (capilar)
- Tubos de ensayo con tapa rosca para esterificar las muestras
- Vasos de precipitación
- Probetas de 10 ml
- Varillas de agitación
- Pipetas Pasteur
- Plancha de calentamiento
- Baño maría
- Pipetas de 1 y 2 ml

Reactivos

- Agua destilada
- Hexano
- Hidróxido de potasio en metanol 0,5 M
- Ácido clorhídrico en metanol 4:1 v/v
- Sulfato de sodio anhidro
- Estándares para ácidos grasos

Procedimiento

Esterificación de ácidos grasos

- Pesar en un tubo de ensayo con tapa 50 mg de muestra, añadir 1 ml de KOH/Me OH 0,5 M, tapar el tubo y calentar a ebullición en un baño maría por 30 minutos.
- Luego añadir 0,5 ml de HCl/Me OH 4:1 v/v .
- Calentar en el baño a ebullición por 25 minutos.
- Enfriar el tubo y añadir 2 ml de agua bidestilada, extraer por dos o tres veces con 3 ml de hexano en la primera ocasión, luego 2 ml y finalmente 2 ml.
- Dejar separar las dos fases y extraer la capa superior que es la capa etérea, con una pipeta pasteur. Este extracto colocar en un tubo con tapa.

- Secar con Na_2SO_4 y se concentra con nitrógeno.
- Se diluye con 2ml de hexano y se coloca en diales para inyectar en el cromatógrafo.

INDICE DE PEROXIDOS

Principio

Se denomina “índice de peróxidos” a los mili equivalentes de oxígeno activo contenidos en un kilogramo de la materia ensayada, calculados a partir de yodo liberado del yoduro potásico, operando en las condiciones que se indican en la metódica.

Las sustancias que oxidan al yoduro potásico en las condiciones descritas, se supone son peróxidos u otros productos similares de oxidación de la grasa, por lo que el índice obtenido puede tomarse, en una primera aproximación, como una expresión cuantitativa de los peróxidos de la grasa.

Material y Aparatos

- Navecillas de vidrio de aproximadamente 3 ml para pesada de la grasa.
- Matraces con tapón esmerilado, de aproximación 250ml previamente secados y llenos de gas inerte (anhídrico carbónico o nitrógeno).

Reactivos

- Cloroformo, para análisis, exento de oxígeno por barboteo de una corriente de gas inerte puro y seco.
- Ácido acético glacial puro exento de oxígeno como lo anterior.
- Solución acuosa saturada de yoduro potásico, exento de yodo e iodatos.
- Soluciones acuosas de tiosulfato sódico 0.01N y 0.002N exactamente valoradas.
- Solución indicadora de almidón al 1 % en agua destilada

Procedimiento

Tomar un matraz con cierre esmerilado, de unos 250 ml previamente seco y llenar con un gas inerte, puro y seco (anhídrido carbónico o nitrógeno) .Introducir tan rápidamente como se pueda la muestra del aceite que se desea ensayar , definida en función de los índices presumidos indicados en la tabla # 2.

Agregar 10 ml de cloroformo, en el cual se disuelva rápidamente, la grasa por agitación, 15 ml de ácido acético glacial y 1 ml de una solución acuosa de yoduro potásico.

Cerrar el matraz y mantener en agitación durante un minuto, imprimiéndole un suave movimiento de rotación, conservándolo después en la oscuridad durante cinco minutos, transcurrido este tiempo agregar 25 ml de agua, agitar vigorosamente y valorar el yodo liberado con una disolución de tiosulfato 0.002N, para los aceites de índices inferiores o iguales a 20 y 0.01N para los índices más elevados.

Paralelamente, se efectúan un ensayo testigo, sin aceite , que debe dar un índice nulo.

Cálculos

El índice de peróxido se expresa en miliequivalentes de oxígeno por kilogramo de muestra, y se calculará aplicando la siguiente fórmula.

$$I.P = \frac{V \times N \times 1000}{P}$$

Siendo

V = tiosulfato, en ml, consumidos en la valoración.

N = normalidad de la disolución de tiosulfato.

P = peso, en g, de la muestra tomada para la determinación.

Observaciones

Peso de la muestra

- La toma de las muestras para el ensayo se efectuará tomando una cantidad de grasa de acuerdo con el índice de peróxidos que se presupone y que se indica en el cuadro siguiente.

Tabla # 8. Índice de peróxidos

Índice que se presupone	Peso de la muestra en g.
de 0 a 20	de 2,0 a 1,2
de 20 a 30	de 1,2 a 0,8
de 30 a 50	de 0,8 a 0,5
de 50 a 100	de 0,5 a 0,3

Fuente: Manual de Aceites y grasas comestibles- A. Madrid. Pág. 182

- Para la expresión del índice de peróxidos se han propuesto otras unidades distintas a la adoptada en esta norma y que suelen ser utilizadas, en algunos casos, presentándose a confusiones en la interpretación de resultados. Para evitar estos errores y los inconvenientes que pudiera derivarse de los mismos, en los informes analíticos deberá indicarse siempre la unidad en la que se expresa el índice.
- Para facilitar el paso de una unidad a otra, se indica a continuación, los factores de conversión por lo que deberá multiplicarse, en cada caso, la cifra del índice, expresado en una determinada unidad, para

obtener la cifra equivalente en la unidad que se define en el principio del método.

Tabla # 9. Índice de peróxidos y sus factores de conversión

Índice de peróxidos expresado en	Factor de conversión para calcular el índice expresado en milequivalentes de oxígeno activo por kilogramo de grasa
a.- Microgramos de oxígeno activo por gramo de grasa	0.125
b.- Gramos de oxígeno activo por kg. de grasa	125
c.- Mililitros de solución de tiosulfato sódico 0,01N por kg. De grasa.	0,01
d.- Mililitros de solución de tiosulfato sódico 0,01 N por gramo de grasa	10
e.- Mililitros de solución de tiosulfato sódico 0,002 N por gramos de grasa	2
f.- Milimoles de oxígeno activo por kg.de grasa	2

Fuente: Manual de Aceites y grasas comestibles- A. Madrid. Pág. 183

INDICE DE ACIDEZ (*Método volumétrico*)

Principio

La acidez que figura normalmente en los boletines de análisis, es una expresión convencional del contenido en tanto por ciento de los ácidos grasos libres. También se denomina grado de acidez.

Índice de acidez, expresa el peso en mg de hidróxido potásico necesario para neutralizar un gramo de materia grasa.

Reactivos

- Solución etanólica de hidróxido potásico 0.5N o 0.1N.
- Solución al 1 % de fenolftaleína en metanol de 95% v/v.
- Mezcla etanol- éter etílico, 1:1, neutralizada exactamente con KOH 0.1N etanólica, con fenolftaleína como indicador.

Procedimiento

Preparación de la muestra

Pesar con una aproximación de 0.01g de 5 a 10 g de grasa, en un erlenmeyer de 250 ml. Disolverla en 50 ml de la mezcla etano-éter-etílico. Valorar, agitando continuamente, con KOH 0.5N (o con 0.1N para acideces inferiores a 2) , hasta viraje del indicador.

Cálculos

Calcular la acidez como grado de acidez expresado en porcentaje de ácido oleico o como índice de acidez expresado en mg KOH.

$$\text{Grado de acidez} = \frac{V \times M \times N}{10p} \text{ \% de ácido oleico}$$

$$\text{Índice de acidez} = \frac{56.1 V \times N}{P}$$

Siendo

V = volumen en ml de solución etanólica de KOH utilizada.

N = normalidad exacta de la solución de KOH utilizada.

M = peso molecular de ácido en que se expresa la acidez.

P = peso en gramos de la muestra utilizada.

Normalmente se expresa referida a tanto por ciento de ácido oleico. Solo en casos particulares, según la naturaleza de la sustancia grasa, se expresará referida a ácido palmítico, láurico u otros.

Observaciones

Cuando se utilice electrodos simples, la unión entre la disolución saturada de cloruro de potásico y la disolución de medida es conveniente hacerla a través de una espiga de porcelana porosa de unos 3 cm. de longitud o por cualquier otro sistema que impida una difusión apreciable entre ambas disoluciones durante el tiempo que dura la valoración.

ÍNDICE DE SAPONIFICACIÓN (*Método volumétrico*)

Principio

El índice de saponificación expresa el peso en mg de hidróxido potásico necesario para saponificar un g de grasa.

Este método es aplicable a aceites y grasas con un contenido de ceras inferior al 15%.

Material y Aparatos

- Matraz de vidrio, inatacable por los ácidos, de 200 ml aproximadamente, adaptable a un refrigerante de reflujo.

Reactivos

- Solución etanólica de hidróxido de potásico, 0.5N.
- Solución acuosa de ácido clorhídrico 0.5N.
- Solución de fenolftaleína al 1% en etanol de 95°.

Procedimiento

Preparación de la muestra

- Pesarse con una precisión de 1 mg, en el matraz de vidrio, 2g aproximadamente de grasa.
- Agregar 25 ml exactamente medidos de solución etanólica de KOH 0.5 N. Adaptar el refrigerante de reflujo, llevar a ebullición, y mantener durante 60 minutos, agitando por rotación de cuando en cuando. Retirar de la fuente de calor. Agregar 4 o 5 gotas de fenolftaleína, y valorar la solución jabonosa, todavía caliente, con la solución de ácido clorhídrico 0.5N.
- Realizar en las mismas condiciones en ensayo en blanco.

Cálculos

Calcular el índice de saponificación expresado en mg de KOH por g de grasa.

$$\text{Índice de saponificación} = \frac{56.11 \times N(V - V')}{P}$$

Siendo

V = volumen, en ml, de solución de HCl 0.5N utilizados en la prueba en blanco.

V' = volumen, en ml, de solución de HCl 0.5N utilizados en el ensayo.

N = normalidad exacta de la solución de ácido clorhídrico utilizado.

P = peso, en g, de la muestra de grasa.

Observaciones

Para ciertas materias grasas difíciles de saponificar es necesario calentar durante más de 60 minutos.

INDICE DE YODO (*Método de Wijs*)

Principio

El índice de yodo de un cuerpo graso es función de su grado de insaturación. Se determina añadiendo a la muestra un exceso de reactivo halogenado, valorando el reactivo que no reacciona.

Se expresa convencionalmente por el peso de yodo absorbido por cien partes en peso de la materia grasa.

Materiales y Aparatos

- Navecillas de vidrio de 2 a 3 ml de capacidad.
- Matraces erlenmeyer de vidrio, de boca ancha, con tapón esmerilado, de aproximadamente 300 ml todo el material debe estar perfectamente limpio y seco.

Reactivos

- Solución acuosa de yoduro potásico al 10 %p/v. Esta solución debe estar exenta de yodo y de yodato potásico.
- Solución acuosa de tiosulfato sódico, 0.1N
- Tetracloruro de carbono puro. Comprobar que este exento de materias oxidantes. Agitando 10 ml con 1 ml de solución acuosa saturada de dicromato potásico y 2 ml de ácido sulfúrico concentrado, no debe aparecer coloración verde.
- Engrudo de almidón.
- Reactivo de Wijs.
 - Con tricloruro de yodo. Pesar 9 g de tricloruro de yodo ICl_3 en un matraz de vidrio topacio de 1500ml; disolver en un litro de una mezcla compuesta de 700ml de ácido acético y 300ml de tetracloruro de carbono.
 - Determinar el contenido en halógeno en la forma siguiente: Tomar 5 ml y agregar 5 ml de la solución acuosa de la solución de yoduro potásico y 30 ml de agua. Valorar con solución de tiosulfato sódico, 0.1N en presencia de engrudo de almidón como indicador.
 - Agregar al reactivo 10g de yodo pulverizado, y disolver agitando.
 - Determinar el contenido en halógeno como anteriormente; debe ser igual a ves y media de la primera determinación. Agregar todavía una pequeña cantidad de yodo, de forma que sobrepase ligeramente el límite de vez y media, es necesario que no quede ninguna traza de tricloruro de yodo, cuya presencia provocaría reacciones secundarias.
 - Dejar decantar después de verter el líquido claro en un matraz o frasco de color topacio. La solución, bien conservada al abrigo de la luz puede ser utilizada durante varios meses.
 - Con monocloruro de yodo. Disolver 19g de monocloruro de yodo en un litro de una mezcla de 700ml de ácido acético y 300ml de tetracloruro de carbono. Después de agregar una pequeña cantidad de yodo puro (algunos miligramos), determinar el contenido en halógeno como se realizó anteriormente, y diluir si es necesario, con la mezcla de disolventes hasta que 5 ml de reactivo correspondan aproximadamente a 10ml de solución de tiosulfato sódico 0.1N.

Procedimiento

Según el índice previsto, la toma de muestras varía de la forma siguiente:

Tabla # 10. Índice de yodo previsto

Índice que se presupone	Peso de la muestra en g.
<5	3,00
5 a 20	1,00
21 a 50	0,60
51 a 100	0,30
101 a 150	0,20
151 a 200	0,15

Fuente: Manual de Aceites y grasas comestibles- A. Madrid. Pág. 171

- En una pequeña navicilla de vidrio, pesar exactamente la cantidad necesaria con un aproximación de 1 mg introducir la navicilla y su contenido en un erlenmeyer con tapón esmerilado de aproximadamente 300ml. Agregar 15 ml de tetracloruro de carbono y disolver. Agregar exactamente 25 ml del reactivo. Tapar el matraz, agitar ligeramente, y protegerlo de la luz.
- Dejar estar 1 hora para grasas cuyo índice sea inferior a 150, y 2 horas para las de índice superior a 150, y los aceites polimerizados u oxidados.
- Agregar 20 ml de la solución de yoduro potásico y 150 ml de agua.
- Valorar con solución de tiosulfato sódico 0.1N, en engrudo de almidón como indicador, hasta desaparición justa del color azul después de agitación intensa.
- Hacer un ensayo en blanco sin materia grasa en las mismas condiciones.

Cálculo

$$\text{Índice de yodo} = \frac{1.269 \times N (V - V_0)}{P}$$

Siendo

P = peso en g de la muestra

V = volumen, en ml, de la solución de tiosulfato sódico 0.1 N utilizados el ensayo en blanco.

V₀ = volumen, en ml, de la solución de tiosulfato sódico 0.1N utilizados para la materia grasa.

N = normalidad de la solución de tiosulfato sódico utilizada.

MATERIA INSAPONIFICABLE (*Método éter etílico*)

Principio

Se entiende por insaponificable el peso en g de sustancias no saponificables, insolubles en agua y solubles en el disolvente utilizado en la determinación, contenidas en 100g de grasa.

El método es aplicable a todas las materias grasas. Su exactitud es solo aproximada para aquellas grasas con un contenido de insaponificable muy elevado.

Materiales y Aparatos

- Matraz de fondo plano, 200ml adaptable a refrigerante de reflujo.
- Refrigerante de reflujo.
- Embudos de separación de 500ml.
- Estufa graduable a 103° (+ 2).

Reactivos

- Solución de etanólica de hidróxido potásico, aproximadamente 2N en etanol de 95 °v/v.
- Solución acuosa de hidróxido potásico, aproximadamente 0.5N.
- Éter etílico neutro, recién destilado y exento de residuo.
-

Procedimiento

- Eliminar el agua de la muestra por decantación y filtración sobre papel, efectuadas a una temperatura ligeramente superior al punto de fusión de determinados componentes sólidos que hubieran podido separarse de la materia grasa fluida.
- Pesar en el matraz 5 g de materia grasa, con una precisión de 0.01 g.
- Separar la fuente de calor. Desconectar el refrigerante. Trasvasar el contenido del matraz a una ampolla de decantación. Lavar con 100 ml de agua destilada.
- Enjuagar el matraz y el refrigerante con 100 ml de éter etílico, y pasarlos a la ampolla; tapar y agitar vigorosamente, mientras el contenido este ligeramente caliente. Dejar en reposo hasta separación nítida de las dos capas. Si aparece una emulsión persistente causada por una alcalinidad fuerte del medio, añadir una gota de ácido clorhídrico N.
- Separar la capa alcohólico-acuosa y verterla en el matraz empleado en la saponificación.
- Pasar la capa etérea a una segunda ampolla de decantación conteniendo 40 ml de agua..
- Tratar la solución alcohólico-acuosa de jabón dos veces más, con porciones de 100 ml de éter etílico. Reunir las tres fracciones etéreas en la segunda ampolla de decantación. Si las fracciones etéreas reunidas contuviesen materias solidas en suspensión, filtrar y lavar cuantitativamente el filtro con un poco de éter.

- Girar, sobre si mismo, sin sacudidas violentas, la ampolla que contiene el éter y los 40 ml de agua. Una vez separadas las dos capas eliminar la capa acuosa. Lavar la capa etérea dos veces, con 40 ml de agua cada vez, agitando enérgicamente.
- Después, lavar sucesivamente con 40 ml de solución de potasa acuosa 0.5 N, y, por lo menos, dos veces con 40 ml de agua. Continuar los lavados con agua hasta que las aguas del lavado no den coloración rosa a la fenolftaleína.
- Trasvasar cuantitativamente la solución etérea a un matraz tarado de 200 ml; después de reducirla a pequeño volumen por evaporación. Agregar 6 ml de acetona y eliminar completamente el solvente volátil, por medio de una ligera corriente de aire, estando el matraz casi sumergido en un baño de agua hirviendo, en posición oblicua y haciéndole girar. Terminar el secado en estufa a 103°C .
- Después de pesar el residuo, disolverlo en 20 ml de etanol al 95%, v/v, recién destilado y neutralizado; valorar con solución alcohólica de hidróxido potásico 0.1N en presencia de fenolftaleína; si el volumen utilizado de solución alcalina es superior a 0.2ml repetir todo el procedimiento.

Cálculo

Calcular el insaponificable expresado en porcentaje:

$$\text{Insaponificable \%} = \frac{100 \times P'}{P}$$

P' = peso en g del residuo.

P = peso en g de la muestra.

Observaciones

En los certificados de análisis indicar: Método del éter de petróleo.

PROPIEDADES FUNCIONALES

DETERMINACION DE ESTEROLES

Principio

Los esteroides se liberan del aceite al formar complejos con digitonina, entonces los esteroides son quitados de la columna digitonida – celite por elución con dimetil sulfóxido (DMSO). (Precaución: El DMSO es tóxico, se debe manejar con guantes evitando el contacto superficial y en una sorbona). El aceite tiene un rango de 0 – 1 mg de β-sitosterol/100g.

Materiales y equipos

- Cromatógrafo de gases equipado con un detector de ionización de llama
- Microjeringa del 10 μ l
- Columna mixta empacada Tubos de ensayo
- Vasos de precipitación
- Probetas de 10 ml
- Varillas de agitación
- Pipetas Pasteur
- Plancha de calentamiento
- Baño maría
- Pipetas de 1 y 2 ml

Reactivos

- Digitonina
- DMSO
- Celite
- *n* - hexano
- Solución estándar de β -sitosterol
- Cloroformo
- Agua destilada

Procedimiento

Disuelva 900 mg de aceite en 3 ml de *n*-hexano. Cuantitativamente transfiera la solución con una pipeta hacia la columna. Lave la muestra dos veces con 2 ml de *n*-hexano y agregue cada lavado a la columna enjuagando los lados del tubo. Lave la columna con cinco porciones de 2 ml de *n*-hexano. Después de que todo el hexano ha ingresado en la columna, lave con cinco porciones de 2 ml de benceno. Lavar la punta de la columna con benceno para evitar interferencias con los triglicéridos. Deseche el hexano y el benceno. Empiece la elución con 10 ml de DMSO. Colecte el eluido en un tubo para centrífuga

Agregue 3 ml de *n*-hexano al eluido, mezcle y centrifugue. La capa superior es la que contiene a los esteroides y transfiera a otro tubo.

A la capa inferior de DMSO se añade dos porciones de 4 ml de *n*-hexano – benceno (1 + 1) y repita la extracción. Cuidadosamente transfiera el sobrenadante a otro tubo en cada porción.

Mezcle vigorosamente el sobrenadante recolectado en el tubo con 3 ml de H₂O y centrifugue hasta que se aclare. Remover la capa superior y evaporar con N₂ o aire filtrado.

Transferir el residuo a un vial con dos porciones de 0.8 ml de CHCl₃. Después de evaporar el solvente con N₂ o aire filtrado en un baño de vapor,

disolver los esteroides en 0.1 ml de CHCl₃ para análisis de GC (Cromatografía de gases).

Inyectar de 2 – 8 µL de la muestra extraída y realizar los cálculos con una curva estándar.

DETERMINACIÓN DE TOCOFEROLES

Principio

El aceite o la grasa extraída mediante n-hexano, es sometida a una separación por cromatografía líquida de alta resolución en una columna de gel de sílice. Los tocoferoles son dosificados por fluorimetría.

Materiales y Reactivos

- Aceite
- N – hexano
- Dioxano – 1, 4
- DL – a – tocoferol acetato 97%
- DL – a – tocoferol acetato 98%
- δ – tocoferol
- γ – tocoferol

Equipo

- HPLC
- Columna de separación (fase estacionaria): LiChrosorb Si 60, 7 µm; 25 cm x 4,6 mm.
- Fase móvil: n – hexano / dioxano (97 + 3)

Procedimiento

Pesar con exactitud 1 g de aceite donde se presume que se tienen los tocoferoles, en un balón de 20, 50 o 100 ml y enraizar con n-hexano. Inyectar en el equipo.

Tiempos de retención:

α – tocoferol acetato	5 min.
α – tocoferol	8.5 min.
β – tocoferol	12.5 min.
γ – tocoferol	14.5 min.
δ – tocoferol	22.0 min.
α – tocotrienol	11 min.
β – tocotrienol	17.5 min.
γ – tocotrienol	19.0 min.
δ – tocotrienol	29.0 min.

Los diversos tocoferoles presentan una intensidad de fluorescencia diferente a diversas longitudes de onda. Los valores se expresan luego de multiplicar por los factores de cada tocoferol.

Factores (valores indicativos):

α – tocoferol 1.00

α – tocoferol \rightarrow β – tocoferol 0.66

α – tocoferol \rightarrow γ – tocoferol 0.58

α – tocoferol \rightarrow δ – tocoferol 0.53

DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS

Se implementó el método de determinación de ácidos grasos por cromatografía de gases, iniciándose con la esterificación de la grasa, el procedimiento se describe a continuación:

Materiales y equipos

- Cromatógrafo de gases equipado con un detector de ionización de llama
- Microjeringa del 10 μ l
- Columna mixta empacada (capilar)
- Tubos de ensayo con tapa rosca para esterificar las muestras
- Vasos de precipitación
- Probetas de 10 ml
- Varillas de agitación
- Pipetas Pasteur
- Plancha de calentamiento
- Baño maría
- Pipetas de 1 y 2 ml

Reactivos

- Agua destilada
- Hexano
- Hidróxido de potasio en metanol 0,5 M
- Ácido clorhídrico en metanol 4:1 v/v
- Sulfato de sodio anhidro
- Estándares para ácidos grasos

Esterificación de ácidos grasos

- Pesar en un tubo de ensayo con tapa 50 mg de muestra, añadir 1 ml de KOH/Me OH 0,5 M, tapar el tubo y calentar a ebullición en un baño maría por 30 minutos.
- Luego añadir 0,5 ml de HCl/Me OH 4:1 v/v .
- Calentar en el baño a ebullición por 25 minutos.
- Enfriar el tubo y añadir 2 ml de agua bidestilada, extraer por dos o tres veces con 3 ml de hexano en la primera ocasión, luego 2 ml y finalmente 2 ml.
- Dejar separar las dos fases y extraer la capa superior que es la capa etérea, con una pipeta pasteur. Este extracto colocar en un tubo con tapa.
- Secar con Na_2SO_4 y se concentra con nitrógeno.
- Se diluye con 2ml de hexano y se coloca en diales para inyectar en el cromatógrafo.

DETERMINACIÓN DEL COLOR

INDICE DE COLOR ((*ABT*))

Principio

Este método tiene por objeto establecer una escala de índices para la denominación del color de los aceites de oliva y semillas, que no contengan, examinados por la visión humana, tonalidades rojizas, es decir, que sólo representen tonalidades variables del amarillo al verde.

El índice de color ABT indica cuantos ml de una disolución 1/15 M de fosfato disódico de Sorensen deberá contener por litro, una mezcla de dicha solución con otra 1/15 M de fosfato monopotásico, para que agregando un número suficiente de ml de una disolución al 0.04% de azul de bromotimol, preparada en la forma que se indica más adelante, se origine una coloración idéntica a la del aceite, examinando por transparencia, con la visión humana, una capa de 25 mm de espesor, de la materia grasa y de la disolución patrón.

Materiales y Equipos

- Tubos de ensayo.

Reactivos

- Disolución 1/15 M de fosfato monopotásico. Disolver 9.078 g de KH_2PO_4 en agua destilada y hervida, hasta completar 1 litro.
- Disolución 1/15 M de fosfato disódico. Disolver 11.88 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en agua destilada y hervida, hasta completar 1 litro.
- Disolución de azul de bromotimol al 0.04%. Triturar en un mortero de ágata 0.1 g de azul de bromotimol, agregar, poco a poco, y

removiendo, 3.5 ml de NaOH 0.05 N. Cuando se ha disuelto, observándose sólo una turbidez ligera, llevar íntegramente la disolución a un matraz aforado de 250 ml, utilizando para lavar el mortero agua destilada y hervida. Agregar al matraz agua destilada y hervida hasta completar la cuarta parte de su volumen, y calentar en baño de agua a 80-90°C, hasta disolución completa. Enfriar hasta la temperatura ambiente, completando con agua destilada y hervida, hasta el enrase.

Procedimiento

Tabla # 11. Disoluciones para la preparación de la muestra

Índice ABT	Disolución 1/15 M en ml de KH ₂ PO ₄	Disolución 1/15 M en ml de Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O
0	50.00	0.00
25	48.75	1.25
50	47.50	2.50
75	46.25	3.75
100	45.00	5.00
125	43.75	6.25
150	42.5	7.50
175	41.25	8.75
200	40.00	10.00

Fuente: Manual de Aceites y grasas comestibles- A. Madrid. Pág. 146

- Preparación de los patrones de color. Poner en cada uno de los nueve tubos de vidrio, los volúmenes de las disoluciones de fosfato monopotásico y disódico que se indican en el cuadro que figura arriba. Agregar 2 ml de la disolución de azul de bromotimol y agitar los tubos.
- En esta escala el índice 0 corresponde al patrón con coloración amarilla y el 200 al de la verde, presentando los intermedios, tonos verdosos ascendentes del 0 al 200.
- Si es necesario preparar otras series con las mismas mezclas de fosfatos, pero poniendo volúmenes mayores o menores de azul de bromotimol, para obtener intensidades más fuertes o más débiles del tono normal que se fija en éste método. Designar estos nuevos índices colocando entre paréntesis, a continuación de los que se establecen en este método, el número de ml de azul de bromotimol utilizados.
- Estos patrones se conservan mucho tiempo en la oscuridad, bastando en general una comprobación cada 6 meses, por comparación con disoluciones recién preparadas.

- Determinación del índice de color. El aceite cuyo color se quiere describir, debe tener una temperatura aproximada de 20 °C y estar completamente transparente, filtrándose si se presenta turbidez.
- Llenar de aceite hasta las tres cuartas partes uno de los tubos; observar por transparencia, mirando en dirección normal al eje del tubo, con cual de los colores escala de patrones se identifica, colocando detrás de los tubos una hoja de papel blanco.

Expresión de Resultados

El índice de color se expresará por un número, correspondiente a los ml del patrón con el que se ha identificado la muestra.

DETERMINACION DE ANTOCIANINAS

Método espectrofotométrico, adaptado en el Dpto. de Nutrición y Calidad del INIAP.

Principio.

La determinación de los pigmentos (antocianinas) se hace con un extracto de alcohol n-amílico acidificado. La lectura se hace a 544nm, que corresponde al espectro de máxima absorción de los pigmentos.

Reactivos.

- Ácido clorhídrico fumante EM (Cod, Merck 113386) concentración 36.5-38 %, densidad 1.19
- Ácido clorhídrico 0.1N. Toma 8.06 ml de ácido 36.5-38 % de pureza, en un balón aforado de a litro y llevar a volumen con agua destilada, homogenizar bien.
- Alcohol n-amílico saturado con HCl 0.1N (mezclar 50 % alcohol n-amílico y 50 % ácido clorhídrico 0.1N)

Procedimiento

- Pesar 1 gramo de muestra
- Añadir 20 ml de HCL 0.1N, mezclar bien. Dejar en reposo durante una hora, mezclando ocasionalmente.
- Transferir el contenido a un tubo de centrifugación sin enjuagar.
- Centrifugar por 20 minutos a 3000 – 4000 rpm.
- Tomar 10 ml de sobrenadante ácido extraído con una pipeta y transferir a un cilindro graduado
- Añadir 10 mL de alcohol n- amílico saturado con HCl 0,1 N
- Agitar durante un minuto, transferir a un tubo de centrífuga y separar a las dos fases a 3000 – 4000 rpm durante 5 minutos

Medida espectrofotométrica

Para el reconocimiento de las antocianinas, tomar con una pipeta una cantidad suficiente de la capa superior y transferirla a la celda. Medir la densidad óptica de las muestras a 544 nm, usando alcohol n- amílico saturado con HCl 0.1 N como blanco.

DETERMINACION DE POLIFENOLES

Método de la A.O.A.C. 1996 (33), adaptado en el Dpto. de Nutrición y Calidad.

Reactivos

- Solución estándar de ácido gálico de 200 ppm
- Ácido gálico monohidratado
- Reactivo Folin ciocalteus
- Carbonato de sodio al 20 %
- Metanol al 70 %, densidad 0.872 g/ml.

A partir de la solución estándar (200 ppm) se hace diluciones para obtener la curva:

Tabla # 12 Disoluciones para obtener la curva a partir de la solución madre

ppm	ml
5 ppm	250 ul de la solución y aforar a 10 ml
10 ppm	500 ul de la solución y aforar a 10 ml
40 ppm	2 ml de la solución y aforar a 10 ml
80 ppm	4 ml de la solución y aforar a 10 ml
100 ppm	5 ml de la solución y aforar a 10 ml

Fuente: Método de la A.O.A.C. 1996 (33), adaptado en el Dpto. de Nutrición y Calidad.

Procedimiento

- Pesar 1 g de la muestra.
- Adicionar 75 ml de metanol al 70%.
- Extraer inmediatamente durante 75 minutos a temperatura ambiente, bajo agitación magnética.
- Filtrar la solución sobre papel filtro y completarla con metanol a 70% a 100 ml.
- Tomar 1 ml y colocar en un tubo de ensayo, añadir 6 ml de agua destilada, 1 ml de reactivo de Folin ciocalteus.
- Después de 3 minutos, adicionar 2 ml de una solución acuosa de carbonato de sodio al 20%.
- Colocar la solución a 40° C por dos minutos.

- Medir la coloración azul en el Espectrofotómetro a 760 nm.

Cálculos y expresión de resultados

Se debe tener en consideración para los cálculos las diluciones realizadas y el peso de la muestra. Los resultados se expresan como sigue:

Ecuación de la curva estándar:

$$mg \text{ polifenoles} / 100g \text{ muestra} = \left(\frac{LR(\mu g / ml) \times V(ml) \times FD \times 10^{-3} (mg / \mu g)}{Pm(g)} \right) \times 100$$

Donde:

Abs= absorbancia a 765 nm

LR = concentración de polifenoles en ug/ml

V = volumen de la solución que da la absorbancia a 760 nm (100 ml)

FD = factor de dilución (1)

Pm = peso de la muestra (1 gramo)

DETERMINACION DE TANINOS

Método de la A.O.A.C. (1964) adaptado en el Departamento de Nutrición y Calidad.

Principio

La determinación de taninos se realiza en una muestra libre de grasas y pigmentos, utilizándose un extracto acuoso el cual reacciona con el reactivo Folin-Denis en medio alcalino. Se utiliza ácido tánico como estándar y se realizan las lecturas en un espectrofotómetro UV VIS a 680 nm.

Reactivos

- Solución de Folin-Denis: Disolver 100g de wolframato de sodio deshidratado, 20g de ácido fosfomolibdico, 50 ml de ácido fosfórico, en 750 ml de agua destilada. Se calienta dos horas a reflujo, se enfría y se afora a un litro.
- Solución de carbonato de sodio saturado: En 100ml de agua destilada añadir 35g de carbonato de sodio anhidro, se disuelve en caliente a 70-80°C, se enfría una y se deja precipitar 12 horas, se coloca en la solución algunos cristales de carbonato de sodio decahidratado y luego que cristaliza se filtra a través de lana de vidrio.
- Solución estándar de ácido tánico: Preparar una solución madre de 100 ppm de ácido tánico, cada vez que se va a realizar esta determinación.

Procedimiento

- Se pesa 1 g de muestra y se extrae durante 8 horas con hexano.
- Se coloca en ebullición el residuo durante 2 horas con 300ml de agua destilada.
- Se enfría, se filtra y se diluye a 500 ml.
- Se toma alícuotas del filtrado en balones de 50 ml, se añade 2.5ml de reactivo Folin-Denis, 5 ml de solución de carbonato de sodio y se afora a 50ml con agua destilada.
- Se lee en un espectrofotómetro a 680nm, después de 30 minutos que ocurre la reacción.
- Se prepara una curva patrón de ácido tánico de 0-5 ppm, proceder desde la adición del reactivo Folin-Denis.

Cálculos

Se debe tener en consideración para los cálculos las diluciones realizadas y el peso de la muestra. Los taninos vienen expresados como Ac. Tánico y los resultados se expresan como siguen:

$$mg \text{ taninos} / g \text{ muestra} = \left(\frac{LR(\mu g / ml) \times V(ml) \times FD \times 10^{-3} (mg / \mu g)}{Pm(g)} \right)$$

Donde:

LR = lectura de regresión.

V = volumen final.

FD = Factor de dilución.

Pm = peso de la muestra.