

ESTUDIO CUANTITATIVO Y COMPARATIVO DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL EN SOJA POR MÉTODO FRAP

S. N. Hernández Guiance, D. M. Isern

Universidad del Centro Educativo Latinoamericano. E-mail: shguiance@ucel.edu.ar

RESUMEN

La evaluación de la actividad antioxidante, asociada a los metabolitos presentes en los vegetales, ha mostrado efectos benéficos para la salud. Dentro de este marco, el objetivo principal del presente artículo es cuantificar el contenido de compuestos antioxidantes que contrarrestan los radicales libres –causantes de enfermedades como el envejecimiento prematuro, cataratas, carcinogénesis en tejidos y órganos vitales y arteriosclerosis– mediante la evaluación de la actividad antioxidante en diferentes muestras de soja. Para tal fin, se empleó el método FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Power), seguido de la cuantificación de dicha capacidad por medio de la técnica espectrofotométrica. Esta metodología se basa en el poder que tiene una sustancia antioxidante para reducir el Fe^{3+} a Fe^{2+} que es menos antioxidante. El complejo férrico-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) incoloro es reducido al complejo ferroso coloreado. Se observa una relación proporcional entre el contenido proteico y la capacidad antioxidante de las muestras estudiadas, aunque no se observa relación entre el contenido de humedad, el contenido graso y la capacidad antioxidante de las muestras estudiadas.

Palabras clave: Flavonoides, espectrofotometría, FRAP.

ABSTRACT

The evaluation of antioxidant activity, associated with metabolites in vegetables, has shown beneficial effects on health. Within this framework, the main objective of this article is to quantify the content of antioxidant compounds that counteract free radicals - causing diseases such as premature aging, cataracts, carcinogenesis in vital tissues and organs and atherosclerosis - by evaluating antioxidant activity in different samples of soy. For this, the FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Power) method was used, followed by quantification of said capacity by means of the spectrophotometric technique. This methodology is based on the power of an antioxidant substance to reduce Fe^{3+} to Fe^{2+} that is less antioxidant. The colorless ferric-2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ) complex is reduced to the colored ferrous complex. A proportional relationship is observed between the protein content and the antioxidant capacity of studied samples, although no relationship is observed between the moisture content, the fat content and the antioxidant capacity of the studied samples.

Keywords: Flavonoids, spectrophotometry, FRAP.

Introducción

En la actualidad, la actividad antioxidante de los alimentos está captando el interés de la población, debido a que existe una evidencia científica de que los antioxidantes presentes en los alimentos promueven la salud humana. Muchos antioxidantes naturales presentan buenos efectos biológicos, incluyendo los antibacterianos, antivirales, antialérgicos y antitrombóticos.

Los alimentos que presentan mayor actividad antioxidante son los ricos en vitaminas, compuestos fenólicos y entre ellos principalmente los flavonoides. Uno de los alimentos con más propiedades antioxidantes es la soja, dado que es capaz de neutralizar la acción oxidante de una entidad molecular inestable, los radicales libres, sin perder su propia estabilidad electroquímica. A los radicales libres producto del estrés de diferentes tipos, condiciones anormales de radiación, etc., se les atribuye ser causantes de los procesos de envejecimiento y de otras enfermedades. Los antioxidantes, por lo tanto, son un grupo amplio de compuestos: vitaminas, compuestos fenólicos, minerales, colorantes naturales y enzimas que logran contrarrestar este efecto.

El estrés oxidativo y los daños que provoca en la salud humana: El oxígeno está asociado a los procesos aerobios empleados por organismos vivos que lo emplean para el mantenimiento del metabolismo y la viabilidad celular. Sin embargo, este gas es responsable de la formación de intermediarios parcialmente reducidos altamente reactivos, llamados *especies reactivas de oxígeno* (ROS). Las ROS son radicales libres (RL) o precursores de radicales, ya que en los orbitales de los átomos que las componen, los electrones giran en pares con un espín particular, otorgando la máxima estabilidad natural. En cambio, si hay electrones desapareados en un orbital, se generan especies moleculares altamente reactivas que tienden a robar un electrón de cualquier otro átomo para compensar su deficiencia electrónica. El oxígeno, por lo tanto, es el principal radical libre, ya que tiene dos electrones desapareados [1]. Entre las ROS se destacan:

Radicales: ión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxilo ($\cdot OH$), alcoxilo ($RO\cdot$), peróxilo ($ROO\cdot$) y óxido de nitrógeno ($NO\cdot$). *No radicales:* peróxido de hidrógeno (H_2O_2), oxígeno singlete¹ 1O_2 y peroxinitrito ($ONOO\cdot$).

Las ROS tienen un origen tanto endógeno como exógeno. Entre las fuentes endógenas se destacan:

1. *La cadena respiratoria*, donde la reducción monovalente de la molécula de oxígeno da lugar a la formación de la mayoría de las ROS.
2. *Las células fagocitarias* (neutrófilos, monocitos o macrófagos): utilizan el sistema de la NADPH oxidasa generando directamente al ión superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Además, como mecanismo de defensa, dichas células también generan óxido de nitrógeno ($NO\cdot$), por acción de la óxido-nítricosintasa sobre la arginina intracelular. La combinación del $O_2^{\cdot-}$ con el NO da lugar a la formación del $ONOO\cdot$ capaz de inducir peroxidación lipídica en las lipoproteínas.
3. *La autooxidación de compuestos de carbono* tales como aminoácidos, proteínas,

¹ El *oxígeno singlete* es una forma energéticamente excitada de la molécula de oxígeno (O_2), con dos electrones apareados en los orbitales de energía más alta (orbital antienlazante), $\pi^* 2p$. Es menos estable que el oxígeno triplete normal, $^3\Sigma_g^-$, conteniendo una energía adicional de 22kcal/mol. El oxígeno singlete puede persistir durante más de una hora a temperatura ambiente, en función del entorno.

lípidos, glicósidos y ácidos nucleicos.

4. *La activación catalítica de diversas enzimas del metabolismo intermediario* como la hipoxantina, xantina oxidasa, aldehído oxidasa monoamino oxidasa y ciclooxigenasa, lipoxigenasa [2].

Las fuentes exógenas de radicales libres pueden ser:

1. *Ambientales*: radiación electromagnética, luz solar, ozono, tabaco, etc.
2. *Farmacológicas*: xenobióticos, drogas, etc.
3. *Nutricionales*: contaminantes, aditivos, pesticidas, etc.

Características de los antioxidantes: Las principales características de un compuesto o sistema antioxidante son:

- la prevención o detección de una cadena de propagación oxidativa mediante la estabilización del radical generado, y
- la regeneración del antioxidante radicalario, ayudando así a reducir el daño oxidativo en el cuerpo humano [3].

Fuentes naturales de los antioxidantes en alimentos: En el organismo se produce un equilibrio entre oxidantes y antioxidantes. Cuando este equilibrio se rompe a favor de los oxidantes se produce un estrés oxidativo, que puede producirse en muchos procesos fisiopatológicos. Por tanto, es de vital importancia el consumo de alimentos que contengan antioxidantes naturales, para mantener este equilibrio o incluso favorecer la presencia de antioxidantes [4]. En los últimos años ha cobrado especial interés el estudio de la actividad biológica de los polifenoles y su capacidad antioxidante. Los polifenoles en vegetales, frutas y té pueden prevenir enfermedades degenerativas. Se ha comprobado también su capacidad para actuar como donadores de hidrógenos o quelar² iones metálicos como el hierro y el cobre, inhibiendo la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL)³, implicadas en la patogénesis de las enfermedades coronarias. Cabe mencionar que algunos polifenoles (como los aislados del té) inhiben la oxidación de las LDL *in vitro* [5]. En experimentos *in vitro*, también se ha confirmado el papel protector de la quercetina, la cual ejerce efectos de inhibición frente a células cancerígenas en humanos: en colon [6], glándula mamaria y ovario [7], en región gastrointestinal [8], y en la leucemia. En experiencias con animales, una dosis oral de polifenoles suprimió la carcinogénesis de varios agentes carcinógenos. Los polifenoles también demuestran actividad de vasorrelajación y antialérgica [9].

Las plantas como fuentes de antioxidantes se pueden utilizar para la preservación del valor nutritivo previniendo el deterioro oxidativo de lípidos y para propósitos medicinales. La mayor parte de la capacidad antioxidante de los vegetales puede ser debida a los polifenoles que poseen características biológicas extensas y, particularmente, a su propiedad de secuestro de radicales libres. Una gran cantidad de estudios ha establecido que los compuestos fenólicos de los alimentos de origen vegetal, incluyendo los flavonoides, son antioxidantes potentes con efectos antimutagénicos y anticarcinogénicos [10,11].

2 *Quelante*: una especie quelante, secuestrante, o antagonista de metales pesados es una sustancia que forma complejos con iones de metales pesados (quelatos). Una de sus aplicaciones es evitar la toxicidad de los metales pesados para los seres vivos.

3 *Lipoproteína de baja densidad (LDL)*: es un tipo de partícula lipoproteica que actúa principalmente distribuyendo el colesterol desde el hígado a otros tejidos. Su componente proteico es una sola molécula de apoproteína B-100.

Métodos de determinación de radicales libres: La actividad antioxidante de los polifenoles es la propiedad de mayor interés, ya que ha sido blanco de un sinnúmero de estudios; este efecto se debe a que contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos, los cuales reaccionan con los radicales libres. Para determinar esta capacidad antioxidante, se emplean los llamados *Métodos de Transferencia Electrónica* (ET), que se basan en la determinación de radicales libres. No existe un único parámetro para evaluar la capacidad antioxidante de los alimentos. Esta variable, desafortunadamente, no permite utilizar un parámetro análogo y relativamente simple, debido a que esta propiedad es generada por moléculas de diversos tipos, con distinta relación de estructura. Por ello, se recomienda utilizar más de un método de determinación de capacidad antioxidante. En función de la información que se desea obtener estos métodos se pueden clasificar en:

- a. *Determinación indirecta:* la presencia de radicales libres produce la pérdida o aparición de un reactivo, y, por tanto, en presencia de un antioxidante se provoca el aumento o disminución de la señal, como es el caso del método FRAP.
- b. *Determinación directa:* el radical se emplea como un factor de cuantificación al producir una señal analítica, y la adición del antioxidante, antes o después de la generación del radical, provoca una disminución de la señal. En el caso del método DPPH, que es un ensayo de inhibición, la muestra se añade a los sustratos de oxidación antes de que sea generado el radical, ya que la reacción comienza con la adición del oxidante.

Objetivos

El objetivo del presente trabajo es determinar la capacidad antioxidante que presenta el poroto de soja, en función del contenido proteico y de grasa de cada una de las muestras. Los objetivos específicos son los siguientes:

- Determinación cuantitativa.
- Determinación cuantitativa espectrofotocolorimétrica de la actividad antioxidante por el método FRAP.
- Comparación de los valores obtenidos.
- Análisis estadístico de los datos obtenidos.

Metodología de trabajo

Preparación y tratamiento de la muestra: Las muestras fueron otorgadas por la Cámara Arbitral de Cereales, perteneciente a la Bolsa de Comercio de Rosario. Estas se obtuvieron de diferentes regiones geográficas y valores de proteínas, grasas y humedad. Por lo tanto, fueron caracterizadas en base a estas variables, con la finalidad de obtener mayor información respecto del tipo de semilla. El procedimiento fue el siguiente:

1. Cuarteo: las muestras fueron homogeneizadas en un cuarteador.
2. Limpieza: se extrajeron las impurezas y porotos dañados mediante tamizado.
3. Molienda: se tomaron muestras representativas de poroto de soja y se molieron mediante un molino de laboratorio.

4. Determinación del contenido de humedad: se sometió cada muestra a estufas a 102 – 103° C hasta obtener pesada constante, y se obtuvo el porcentaje de humedad por diferencia de peso.
5. Determinación de materia grasa: se determinó el contenido de materia grasa por el método Butt (ver ANEXO I).
6. Determinación del contenido proteico: el contenido de proteínas fue obtenido a partir del método Kjeldahl modificado.



Imagen 1: Muestras de soja empleadas, luego de ser molidas

7. Preparación de los extractos: Los extractos fueron obtenidos por método Butt:
 - a) Se pesaron 6 lotes de muestras, cada uno con tres muestras de 5 g de semilla molida y seca, y se llenaron los cartuchos para el equipo Butt.
 - b) Se colocaron los cartuchos en el equipo Butt agregándoles 100 ml de hexano a cada uno de ellos.
 - c) La extracción de cada una de las muestras llevó tres horas.
 - d) Pasado este período de tiempo, se recuperó el disolvente por evaporación rotatoria, obteniéndose el extracto seco.
 - e) Por otra parte, los cartuchos que aún contenían las semillas se dejaron secar a temperatura ambiente resguardándolos de la luz.

Tabla 1: Valores medios de Humedad, Contenido proteico y Contenido graso de los 6 lotes de muestras de soja

Lotes de muestras	Humedad media (%)	Contenido proteico medio (%)	Contenido graso medio (%)
1	12.9	33.8	20.53
2	12.11	33.37	20.47
3	12.44	33.63	20.74
4	12.18	32.88	20.63
5	12.17	33.48	20.88
6	12.97	33.16	20.92



Imagen 2: Muestras de soja molida en cartuchos para extraer materia grasa, mediante extractor Butt

Determinación de la capacidad antioxidante por método FRAP: En este método se determina la capacidad antioxidante de forma indirecta. Se basa en el poder que tiene una sustancia antioxidante para reducir el Fe^{+3} a Fe^{+2} , que es menos antioxidante.

El complejo férrico-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) incoloro es reducido al complejo ferroso coloreado. Se trata de un método espectrofotométrico ya que se mide la absorbancia del Fe^{+2} . Así, cuanto más antioxidante es la sustancia objeto de estudio, mayor es la reducción y mayor la concentración de Fe^{+2} y más alta la señal de absorbancia. El complejo va a poder ser reducido por productos con potenciales redox menores a 0.7 V (potencial redox del Fe^{+3} -TPTZ).

Debido a que el potencial redox del Fe^{+3} - TPTZ es comparable con el del ABTS se pueden analizar compuestos similares con ambos métodos aunque las condiciones de la reacción sean distintas. El mecanismo del FRAP es de transferencia de electrones, a diferencia de otros métodos donde se produce captura de radicales libres; según esto, el FRAP puede ser útil, en combinación con otros métodos, en la determinación de la capacidad antioxidante de productos que contengan distintos tipos de antioxidantes.

Reactivos y materiales para análisis FRAP

Reactivos: Muestra: extracto seco, éter de petróleo, agua destilada., acetato sódico, ácido clorídrico, complejo férrico-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ), y cloruro Férrico hidratado: $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

Materiales: vasos de precipitado de 300 ml, vasos de precipitado de 100 ml, pipetas graduadas de 10 ml, pro-pipetas, mortero, incubadora y Espectrofotómetro de UV/Vis.

Preparación de reactivos

1. Ácido clorhídrico (HCl) 40mM. Se diluyeron 535 μl de HCl (37%) en 100 ml de agua destilada.
2. Solución TPTZ 10 mM. Se pesaron 0,0312 g del reactivo TPTZ y se disolvieron

- en un matraz de 10 ml con HCl 40 mM.
- Solución $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20 mM. Se disolvieron 0,1352 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en 25 ml de agua destilada.
 - Tampón acetato 0,3 mM pH 3,6. Para 250 ml, se disolvieron 0,0061 g de acetato sódico (NaAc) en 200 ml de agua destilada. Luego se ajustó el pH a 3,6 utilizando HCl 40mM, y se completó hasta los 250 con agua destilada.
 - Solución de trabajo diario FRAP: Esta solución de trabajo se preparó a diario. Se mezclaron 3 ml de solución TPTZ con 3 ml de solución $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20 mM y 30 ml de tampón acetato. Esta preparación se mantuvo durante todo el proceso en el baño a 37°C.

Método de poder reductor FRAP

- Se tomaron 0,5 ml de cada una de las muestras.
- Se le agregaron 9 ml de la solución de trabajo diario FRAP.
- Se añadieron 0,5 ml de agua destilada.
- Luego de 60 min de reacción se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 593 nm.

Resultados

En base a los resultados obtenidos, hay una relación proporcional entre el contenido proteico y la capacidad antioxidante de las muestras estudiadas. En orden decreciente, las muestras son: 4, 6, 5, 2, 3 y 1. No se observa relación alguna entre el contenido de humedad, el contenido graso y la capacidad antioxidante de las muestras estudiadas.

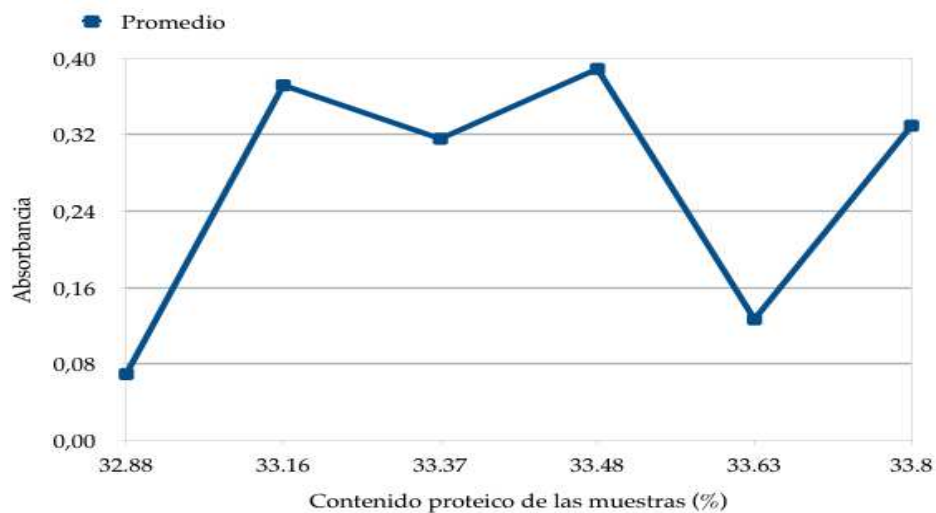


Gráfico 1: Variación de la capacidad antioxidante –medida en base a la absorbancia a 593 nm– de 6 lotes de muestras de soja en función del contenido proteico

En el gráfico 1 se representa la variación de la absorbancia, y, por ende, de la capacidad antioxidante, respecto del contenido proteico para las 6 muestras de soja.

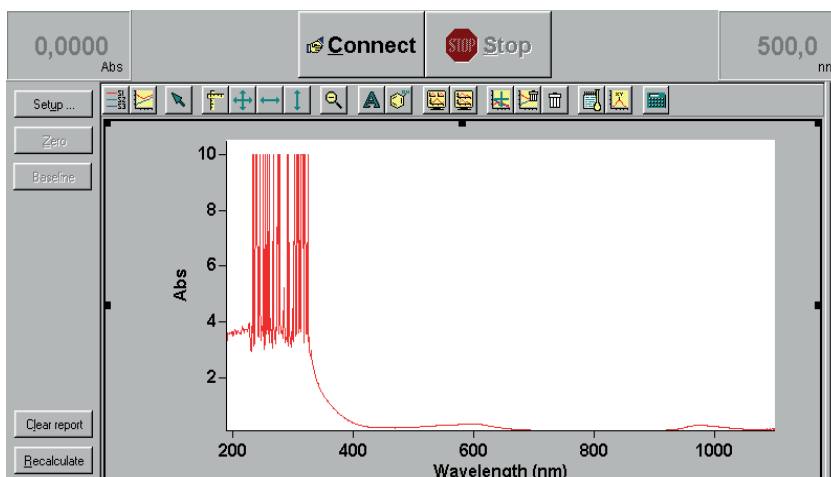


Gráfico 2: Barrido completo de la solución reactivo

Luego de realizar numerosas determinaciones de absorbancia mediante el espectrofotómetro, se pudo confeccionar la presente curva, cuyo comportamiento permite ver una tendencia creciente de la absorbancia conforme aumenta el contenido de proteínas, para cada una de las 6 muestras de soja empleadas en el presente estudio.

Sin embargo, es fundamental continuar con este trabajo aplicando las mismas determinaciones a otras muestras de grano, con la finalidad de reforzar este comportamiento y ampliar las conclusiones y aplicaciones derivadas del presente proyecto.

Tabla 2: Valores medios de Humedad, Contenido proteico, Contenido graso y Absorbancia a 593 nm de las 6 muestras de soja

Lotes de muestras	Humedad media (%)	Contenido proteico medio (%)	Contenido graso medio (%)	Absorbancia					Absorbancia media
1	12.9	33.8	20.53	0,1309	0,2976	0,2955	0,3088	0,3293	0,2976
2	12.11	33.37	20.47	0,3156	0,3886	0,3556	0,3444	0,3379	0,3156
3	12.44	33.63	20.74	0,3798	0,3825	0,3772	0,3780	0,3677	0,1266
4	12.18	32.88	20.63	0,0677	0,0701	0,0712	0,0708	0,0699	0,0692
5	12.17	33.48	20.88	0,3513	0,3891	0,3668	0,3611	0,3883	0,3887
6	12.97	33.16	20.92	0,3784	0,3719	0,3721	0,3723	0,3712	0,3716

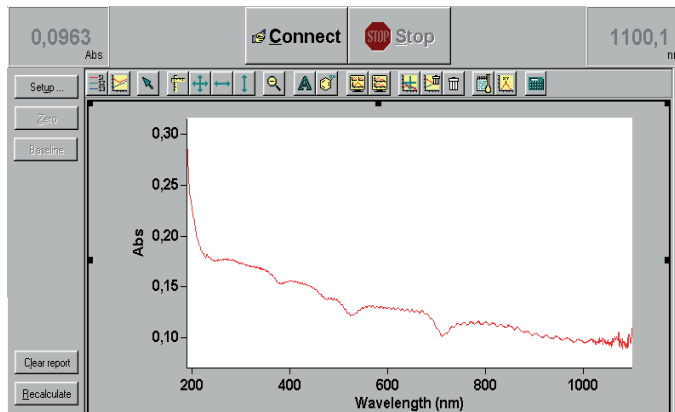


Gráfico 3: Espectro completo de las muestras

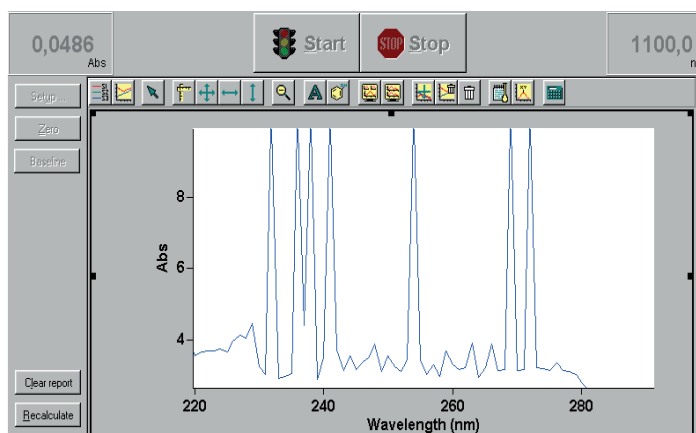


Gráfico 4: Espectro de una muestra de lote 1

Conclusiones

Se observa una relación proporcional entre el contenido proteico y la capacidad antioxidante de las muestras de poroto de soja analizadas, en las cuales un mayor contenido proteico refleja una mayor capacidad antioxidante. Sin embargo, el lote de muestras número 5 no ha mostrado relación con el comportamiento observado en los demás lotes.

Por otra parte, no se observa relación entre el contenido de humedad, el contenido graso y la capacidad antioxidante. Este estudio, por lo tanto, es un punto de partida para continuar con un trabajo de mayor profundidad en cuanto a la determinación de la capacidad antioxidante de alimentos que contienen compuestos flavonoides capaces de revertir el proceso oxidativo celular sin perder su estabilidad electroquímica.

Bibliografía

- [1]. J. Martínez Vázquez (2007): *Evaluación de la actividad antioxidante de extractos orgánicos de semillas de heliocarpus terebinthinaceus*, Tesis, Universidad Tecnológica de la Mixteca, Huajuapán De León, Oaxaca, México.
- [2]. Fridovich, 1976.
- [3]. Namiki, 1990, Gordon, 1990.
- [4]. Cao *et al.*, 1998; Young *et al.*, 1999.
- [5]. Riemersma *et al.*, 2001.
- [6]. Ranelletti *et al.*, 1992.
- [7]. Scambia *et al.*, 1990.
- [8]. Yoshida *et al.*, 1990.
- [9]. Sakakibara *et al.*, 2003.
- [10]. Middleton y Kandaswami, 1994.
- [11]. Rice-Evans *et al.*, 1997.
- [12]. A. R. Rosales, “*Evaluation of antioxidant activity of polyphenolic compounds from marine algae*”, Facultad de Ciencias del Mar (Universidad de Las Palmas de Gran Canaria), Instituto Tecnológico de Canarias, Santa Lucía, España.
<http://www.cenunez.com.ar/archivos/39-ExtraccinconequipoSoxhlet.pdf>
- [13]. <http://es.slideshare.net/audryarias/equipo-soxhlet>
- [14]. Christopher Isaac Escamilla Jiménez, Elvis Yane Cuevas Martínez, Jorge Guevara Fonseca (2009). “Flavonoides y sus acciones antioxidantes”. *Rev Fac Med UNAM* Vol. 52 No. 2. Marzo-abril.
- [15]. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jimenez L. (2004). “Polyphenols. Food sources and bioavailability”. *Am J Clin Nutr* 79: 727-47.
- [16]. Martínez-Valverde I., Periago M.J., Ros G. (2000). “Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta”. *Arch. Latinoamer. Nutr.* 50, 5-18.
- [17]. Mazza (2000). *Alimentos funcionales. Aspectos bioquímicos y de procesados*. Zaragoza, Acribia.
- [18]. Muñoz Jáuregui A.M. y Ramos Escudero F. (2007). “Componentes fenólicos de la dieta y sus propiedades biomedicinales”. *Revista Horizonte Médico*. Vol 7, nº 1. Junio.
- [19]. Olano A., Martínez-Castro I. (1996). *Nonenzymatic browning*. In *Handbook of food analysis*. L.M.L. Nollet, Ed. New York: Marcel Decker, 1683-1721.
- [20]. Ou B., Huagn D., Hampsch-Woodill M., Flanagan, J.A., Deemer, E.K. (2002).
- [21]. “Analysis of antioxidant in common vegetable employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study”. *J.Agric.Food.Chem.* 50. 3122-3128.
- [22]. Pérez-Jimenez J. y Saura-Calixt, F. (2006). “Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays”. *Food Research internacional*, 39, 791-800.
- [23]. Rao A.V., Agarwal S. (2000). “Role of antioxidant lycopene in cancer and heart disease”. *J. Am. Coll. Nutr.* 19:563-9.
- [24]. Ronald L. Prior. (2005). “Standardized methods for the determination of Antioxidant Capacity and phenolics in foods and dietary supplements”. *J. Agric. Food Chem.* 53, 4290-4302.
- [25]. Sánchez-Moreno C. (2002). “Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems”. *Food Sci. Tech. Int*, 8(3), 121-137.

ANEXO I

MÉTODO BUTT

La materia grasa es el valor que indica la cantidad de aceites y compuestos grasos extractables presentes en 100 grs. de muestra seca y limpia, obtenida según el método Butt o por cualquier otro método que dé resultados equivalentes. Cabe aclarar que en todas las reglamentaciones se habla de materia grasa y no de aceite; ello es debido a que en la extracción con solventes se arrastran ceras. El método que se utiliza como patrón para la determinación de materia grasa es el método Butt, cuyo principio es el de extracción por solvente.

Fundamento

Determinación de la materia grasa por extracción con solvente sobre muestra limpia. Consta de los siguientes pasos generales:

1. Cuarteo y preparación de la muestra.
2. Limpieza de la muestra donde se separan los cuerpos extraños.
3. Molienda (en molinillo de cuchillas horizontales).
4. Zarandeo (en zaranda de 2mm), donde tiene que pasar el 99% de la muestra molida.
5. Homogeneización de la molienda.
6. Pesada de 5grs de la muestra molida.
7. Preparación del cartucho con papel de filtro.
8. Extracción de la materia grasa en el cuerpo extractor Butt por solvente, donde el tiempo de extracción varía según el material a analizar.
9. Evaporación del excedente del solvente por estufa.
10. Peso del matraz más la materia grasa obtenida en el proceso de extracción.
11. Cálculo de materia grasa sobre sustancia seca y limpia (s.s.s. y limpia).

Los análisis se realizan por duplicado, se expresan con un decimal y la diferencia analítica entre los duplicados no debe superar el 2%. Si así ocurriera, debe realizarse nuevamente el análisis.

Equipos

- Equipo extractor Butt (según especificación AOCS Aa4 - 38), con calentamiento eléctrico que asegure un goteo constante de 150 gotas por minuto de solvente a usar.
- Estufa con circulación forzada según especificación AOCS H1 - 39.
- Molinillos eléctricos a cuchilla horizontal, de 22.000 - 24.000 r.p.m.
- Zarandas de 20 cm de diámetro con orificios circulares de 2 mm de diámetro.
- Papel de filtro Whatman G P de 15 cm de diámetro o equivalente.
- Balanza analítica.
- Material de vidrio: Conjunto extractor Butt (según especificación AOCS Aa4 - 38).

Reactivos

- Éter de petróleo, Marca Ciccarelli.

1.- MÉTODO PARA DETERMINACION DE MATERIA GRASA EN OLEAGINOSOS

1.1. PROCEDIMIENTO

1. Homogeneizar y pesar 500 g de muestra libre de cuerpos extraños obtenida por cuarteo.
2. Moler en el molinillo de cuchilla horizontal.
3. Homogeneizar y pesar 5 g +/- 0,01 g del material molido.
4. Pasar cuantitativamente a una hoja de papel de filtro y hacer el cartucho según especificación AOCS Aa4 - 38.
5. Pesar inmediatamente la muestra molida para determinar la humedad de referencia.
6. Colocar el cartucho en el conjunto extractor Butt, cuyo matraz ha sido previamente tarado. Agregar 50 ml de hexano y extraer durante el tiempo indicado, según el grano.
7. Finalizada la extracción, evaporar hasta que la mayor parte del solvente haya sido eliminada. Llevar a estufa con circulación forzada, a 130° C durante 1 hora. Enfriar a temperatura ambiente y pesar.

1.2. CÁLCULO:

$$M G \% = \frac{P - T}{M} \times 100 = (P - T) \times 20$$

Siendo:

M G % : Porcentaje de materia grasa sobre sustancia húmeda y limpia.

P : Peso del matraz más materia grasa

T : Tara del matraz

M: Peso de la muestra molida 5 g.

Para obtener el porcentaje de materia grasa sobre sustancia seca y limpia se aplica la siguiente fórmula:

$$M.G. \% \text{ s.s.s.} = \frac{100 * M G \%}{(100 - H \%)}$$

Siendo:

M.G. % S.S.S.: Porcentaje de materia grasa sobre sustancia seca y limpia

M G %: Porcentaje de materia grasa sobre sustancia húmeda y limpia

H %: Porcentaje de humedad de referencia sobre sustancia limpia y molida

El porcentaje de materia grasa se expresará al décimo, las determinaciones deberán efectuarse por duplicado y el promedio no deberá diferir en más del 1 % de los valores parciales obtenidos.

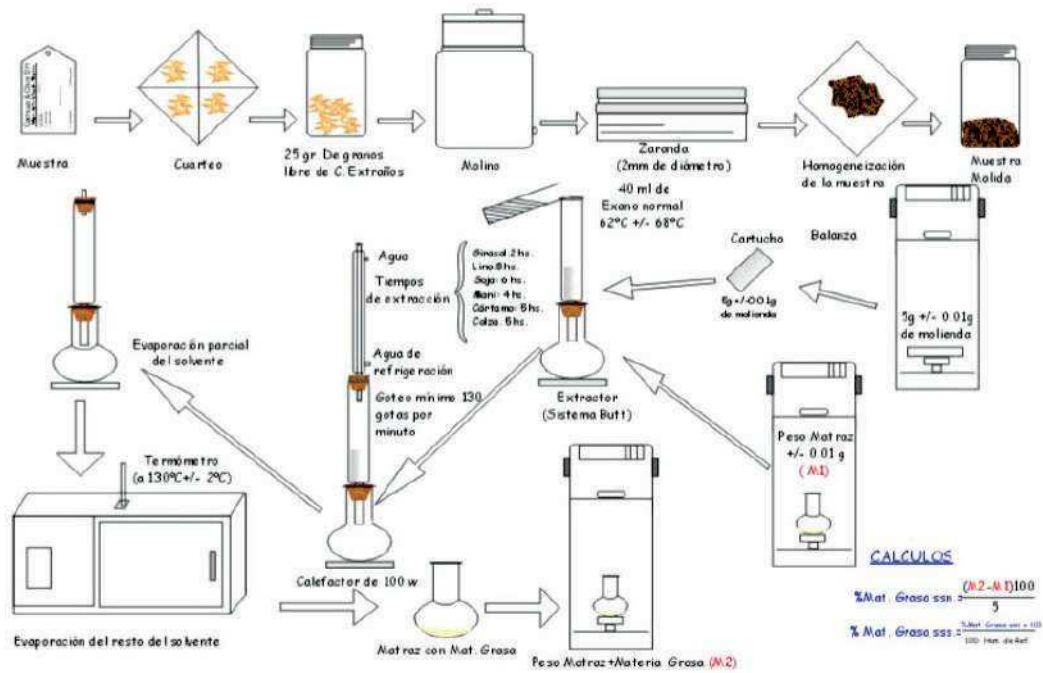


Imagen 3: Esquema para el método de extracción Butt

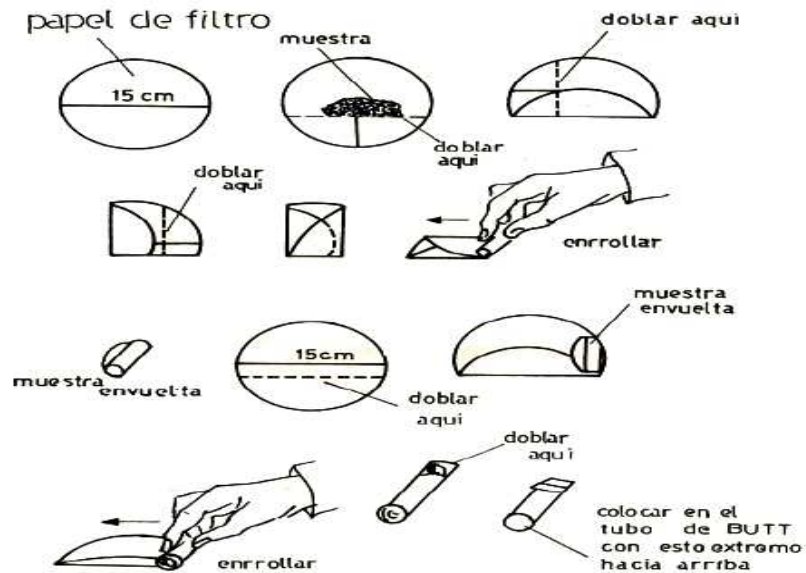


Imagen 4: Formación de cartucho de papel filtrante para extractor Butt

2. - MÉTODO PARA DETERMINACION DE HUMEDAD EN OLEAGINOSOS

2.1. PROCEDIMIENTO:

1. Efectuar la pesada para la extracción de la materia grasa.
2. Rápidamente, homogeneizar y pesar 10 +/- 0,01 g de muestra molida, en cápsulas de aluminio previamente tarada; inmediatamente después de Llevar a estufa a 105 +/- 2° C durante el tiempo indicado según el grano
3. Retirar de la estufa, tapar inmediatamente, enfriar en un desecador hasta temperatura ambiente y pesar.

2.2. CÁLCULO:

$$H \% = \frac{A - B}{C} \times 100$$

H %: Porcentaje de humedad de referencia sobre muestra limpia y molida.

A: Tara cápsula más peso de la muestra antes de secar

B: Tara cápsula más peso de la muestra después de secar

C: Peso inicial de la muestra molida

El porcentaje de humedad se expresará al décimo, las determinaciones deberán efectuarse por duplicado y el promedio no deberá diferir en más del 2 % con respecto a los valores parciales obtenidos.

La construcción del cartucho para la extracción es fundamental en este método, por lo cual hay toda una técnica para su armado. Lo principal es lograr una consistencia tal que no genere el apelmazamiento de la molienda que evitaría el normal paso del solvente para arrastrar la materia grasa: este forma surcos por donde circula el solvente y no se produce la extracción. Lo contrario es dejarlo demasiado flojo, de tal manera que se evite el contacto del solvente, pasando este a través de la molienda sin lograr arrastrar la materia grasa.