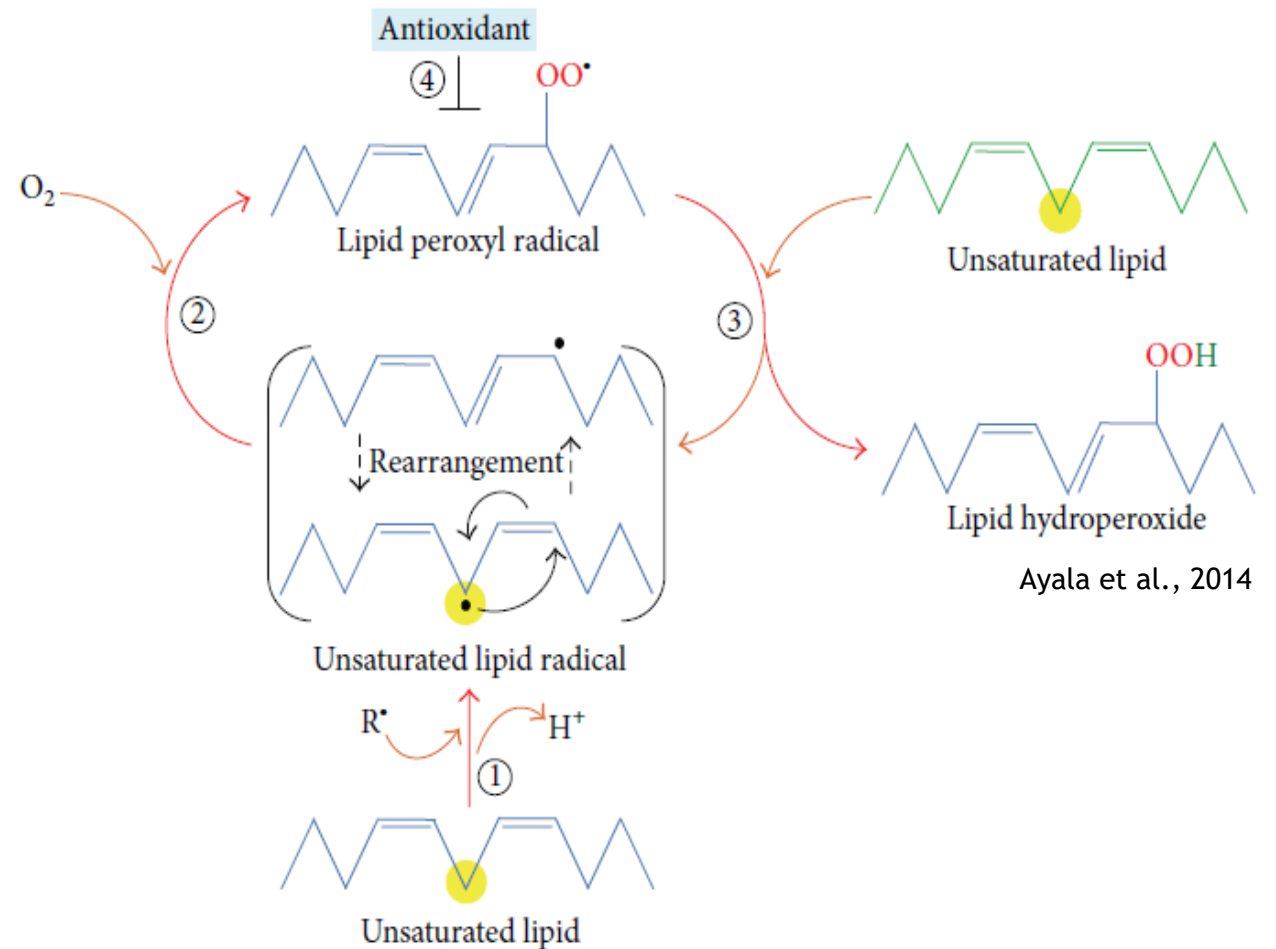


Tutoriales prácticos de aplicación en Alimentación, Nutrición y Trazabilidad en Acuicultura

Práctica 4.3. Protocolo de determinación del índice de peróxidos

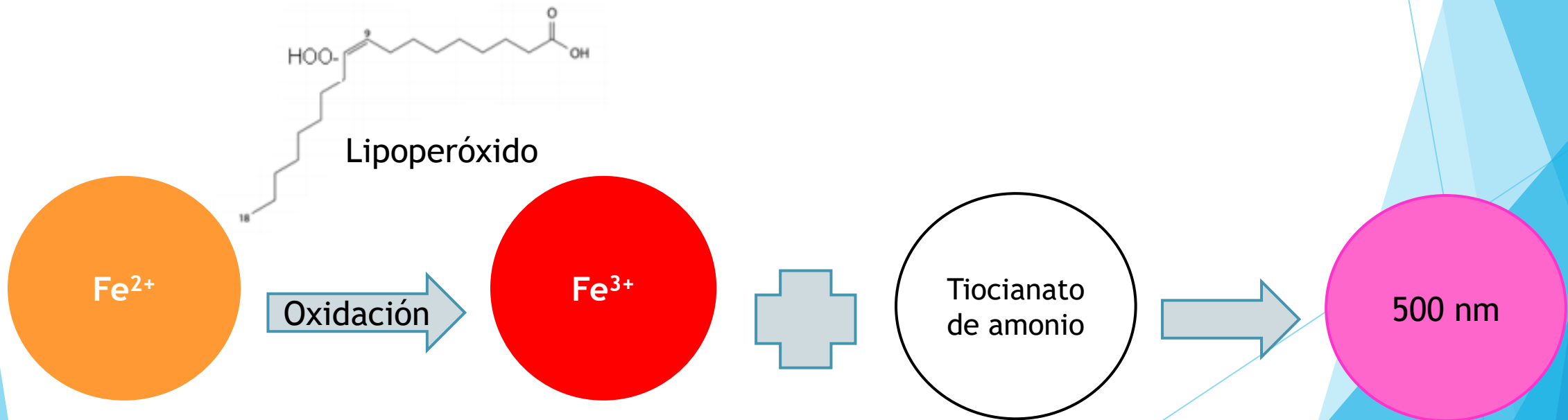
Determinación del índice de peróxidos (IP)

- ▶ La determinación del índice de peróxidos está basada en un método espectrofotométrico (Shantha y Decker, 1994).
- ▶ Este método, rápido y sensible, usa el hierro para la medida de los valores de peróxido. Los lipopéroxidos son compuestos intermedios formados en la peroxidación lipídica



Fundamento

Se basa en la capacidad oxidante que tienen los primeros productos formados en la oxidación de los lípidos, los **lipoperóxidos**. De tal manera que los lipoperóxidos oxidan a los iones Fe^{2+} que se añaden y que se transforman en iones Fe^{3+} . Este Fe^{3+} reacciona con el **tiocianato de amonio** produciendo una sustancia rosa que absorbe a **500 nm**.



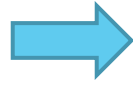
Fundamento

- ▶ La cuantificación se lleva a cabo haciendo una curva patrón con Fe^{3+} , gracias a la cual calculamos la cantidad de Fe^{3+} que genera nuestra muestra lipídica al oxidar al Fe^{2+} añadido, como consecuencia del O_2 activo de sus lipoperóxidos.
- ▶ Posteriormente se calcula el Índice de Peróxidos (IP) que se define como los miliequivalentes de oxígeno activo que hay en cada kg de lípido:

IP= miliequivalentes O_2 activo/kg lípido.

Preparación de reactivos

A. DISOLUCIÓN MADRE DE FeCl_3 , 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (para la curva patrón):



Disolución
"abuela"



1. Disolver 0,5 g de Fe en polvo en ácido clorhídrico (HCl) 10 N y añadir 1-2 mL de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) 30%.

2. Hervir, agitación durante 5 minutos

3. Atemperar y añadir agua destilada hasta 500 mL

Con este proceso hemos oxidado el Fe en Fe^{3+} y conseguido una disolución de FeCl_3 de 1mg/mL: Disolución "abuela"

Disolución "abuela"



4. Se hace una nueva disolución pipeteando 1 mL de la disolución "abuela" que se lleva hasta 100 ml con cloroformo:metanol (cl:met) (7:3)



Disolución madre

Conseguimos una nueva disolución de FeCl_3 de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$: DISOLUCIÓN MADRE

Preparación de reactivos

B. DISOLUCIÓN DE TIOCIANATO DE AMONIO: Se disuelve 3 g de tiocianato de amonio y se añade agua destilada hasta 10 mL.

C. DISOLUCIÓN DE FeCl_2 : Se disuelve 62,7 mg $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ en HCl 3,7% hasta 10 mL.

Ejemplo: Se necesitan 50 μL de cada reactivo para cada muestra y punto de la curva patrón. Si tenemos 10 muestras + 9 puntos de la curva, necesitaríamos $19 \times 50 \mu\text{L} = 950 \mu\text{L}$ de B y C. Hacemos 1.500 μL (1,5 mL) de cada uno.

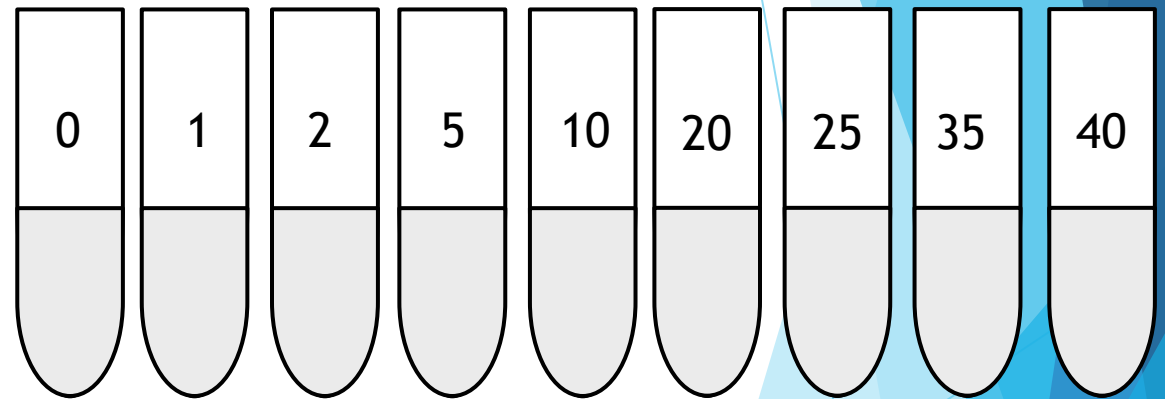
B. Tiocianato de amonio: 0,45 g de tiocianato de amonio + agua dest hasta 1,5 mL

C. FeCl_2 : 9,405 mg de FeCl_2 + HCl 3,7% hasta 1,5 mL

Protocolo

1 A-Se hace la curva patrón a partir de la disolución madre de FeCl_3 (Reactivo A) de $10 \mu\text{g}/\text{mL}$, añadiendo a cada tubo la cantidad de disolución madre y de cl:met (7:3) correspondiente:

μg de Fe^{3+}	Disolución madre (mL)	Cloroformo:metanol (7:3) (mL)
0	0	10
1	0,1	9,9
2	0,2	9,8
5	0,5	9,5
10	1	9
20	2	8
25	2,5	7,5
35	3,5	6,5
40	4	6

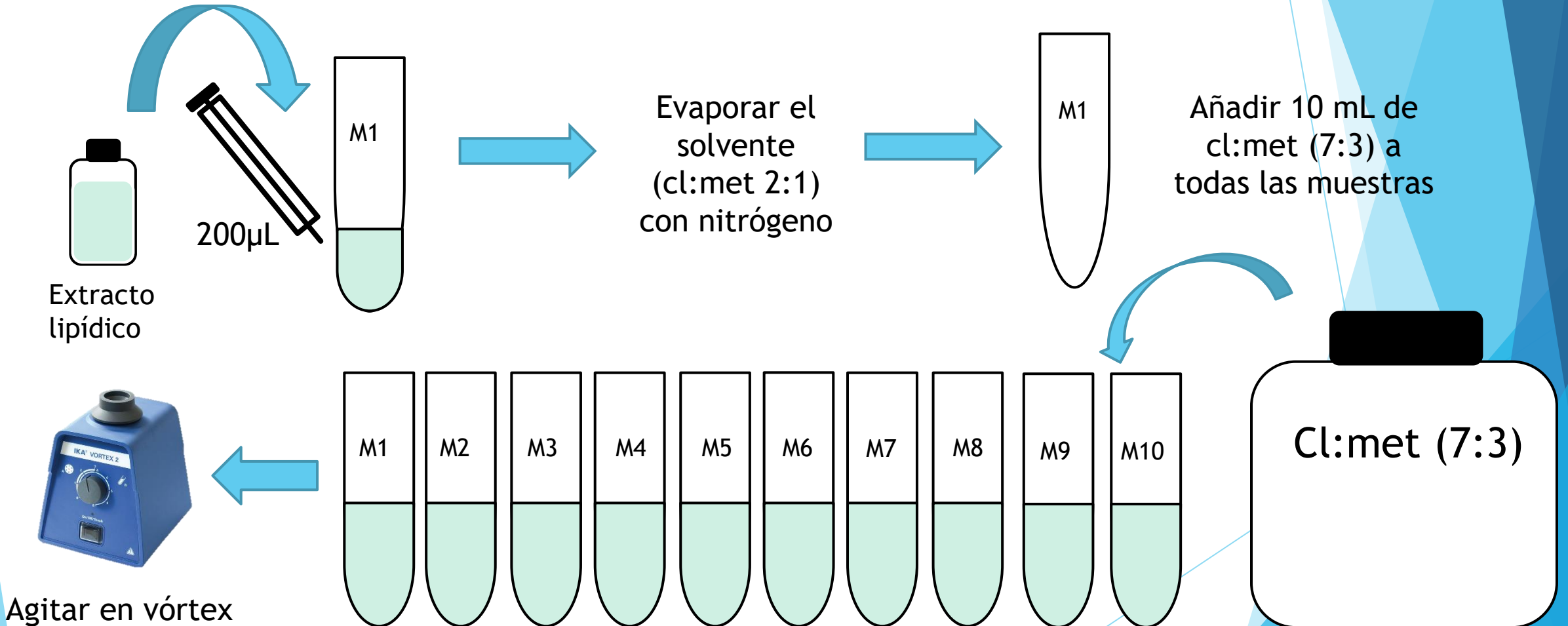


Nota: En tubos de ensayo de vidrio, ya que el cloroformo disuelve el plástico.

Protocolo

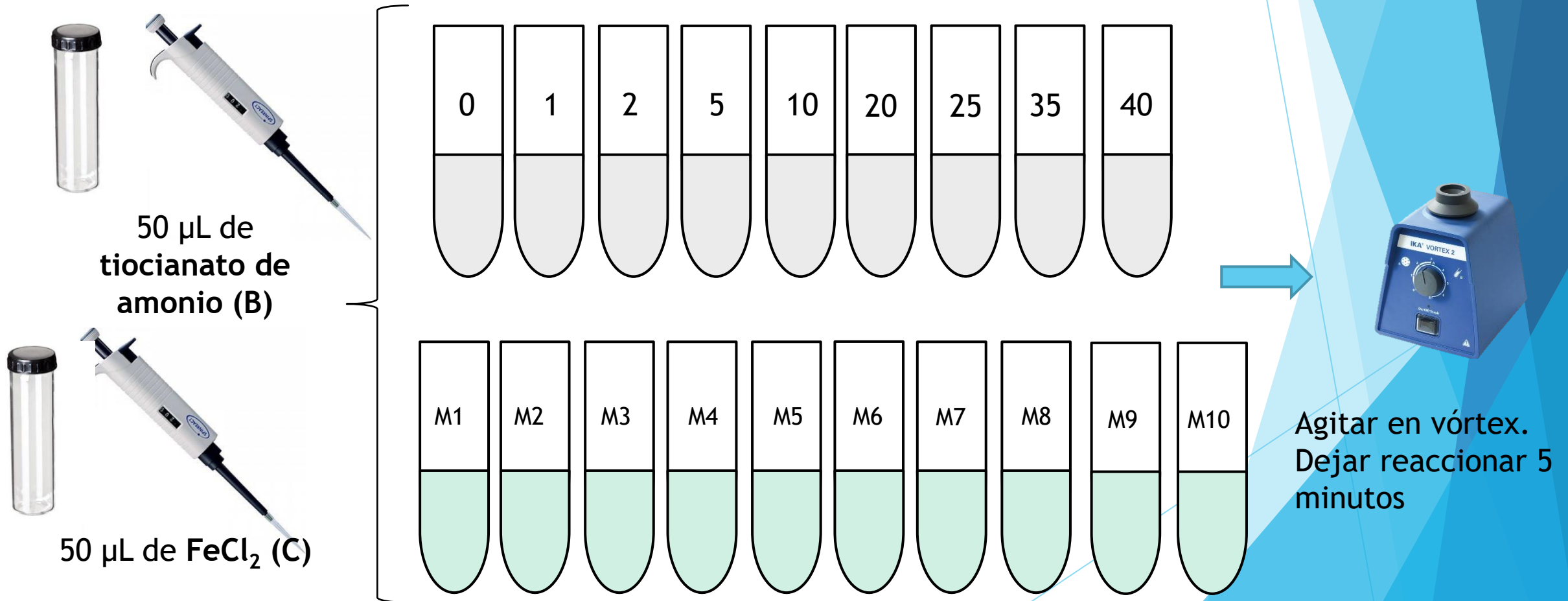
1 B- Pasamos la muestra de lípido, a un tubo de ensayo.

Ejemplo: si mi extracto lipídico a 10 mg/mL y quiero coger 2 mg de lípido, tengo que coger 0,2 mL (200 μ L)



Protocolo

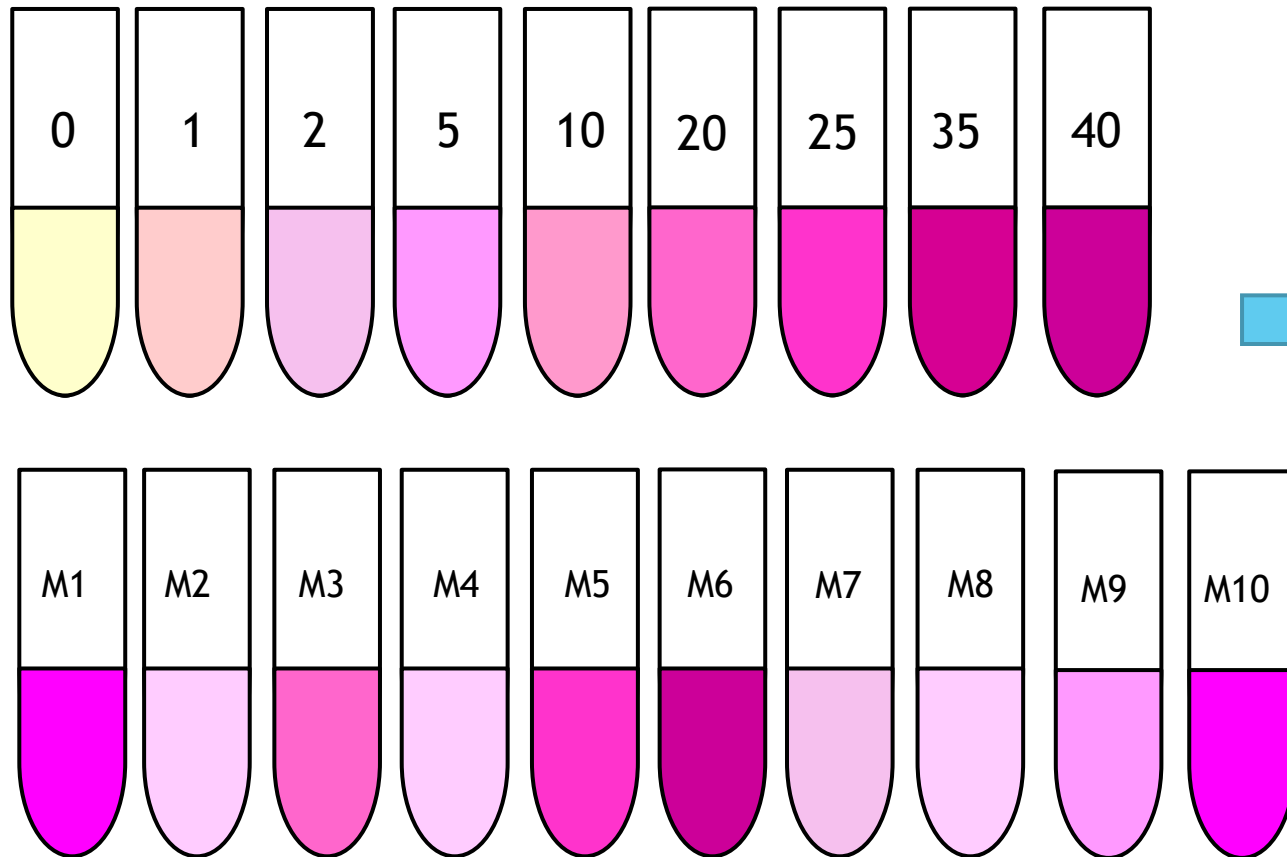
2- Añadir 50 μL de la disolución de **tiocianato de amonio (Disolución B)** y 50 μL de la **disolución de FeCl_2 (Disolución C)** a cada tubo de ensayo (curva patrón y muestras) y agitar en vórtex. Dejar reaccionar 5 minutos



Protocolo

3- Cada punto de la curva mostrará una coloración rosa más intensa conforme aumenta su contenido en Fe^{3+} (del 0 al 40) estando el contenido de Fe^{3+} en nuestras muestras dentro de los puntos de la curva de calibrado. Recordemos que el Fe^{3+} en nuestras muestras se ha generado por la acción de los lipoperóxidos, los cuales oxidan el Fe^{2+} a Fe^{3+} . Por tanto, a mayor contenido de Fe^{3+} , más cantidad de lipoperóxidos tiene la muestra.

Se lee la absorbancia de cada tubo (curva y muestras) a 500nm



Micro cubeta de
vidrio o cuarzo

500 nm

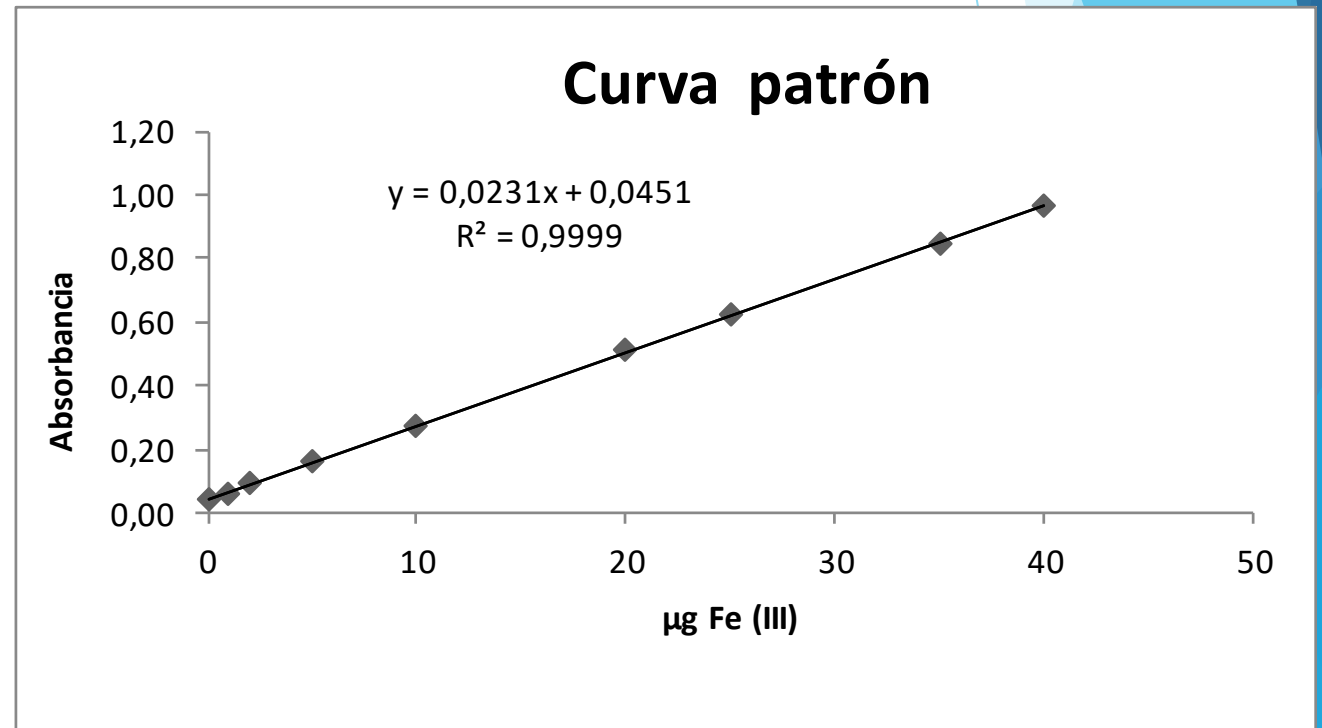
Nota: blanquear en el
espectrofotómetro con Cl:met
(7:3)

Cálculos

4- Con los datos obtenidos, obtenemos la curva patrón representando los μg de Fe^{3+} (Eje X) y la absorbancia (Eje Y)

Calculamos la ecuación de la recta ($y = ax + b$; **Abs = a x μg de Fe^{3+} + b**) para obtener los valores de a y b, y el R^2 para ver cómo se correlacionan las variables, y obtener información sobre el ajuste de la recta patrón.

$\mu\text{g Fe}^{3+}$	Absorbancia
0	0,0459
1	0,0637
2	0,0945
5	0,1584
10	0,2759
20	0,5102
25	0,6241
35	0,8469
40	0,9688



Cálculos

5- A continuación, se calcula el **IP** según la siguiente relación:

$$\text{IP (meq O}_2\text{/Kg lípido)} = \frac{\frac{\text{Abs de la muestra} - b}{a}}{m \times 55,845 \times 2}$$

Donde:

a = pendiente de la recta patrón

b = ordenada en el origen de la recta patrón

m = masa del lípido (g)

55,845 = peso atómico del Fe

2 = necesario para obtener equivalentes de oxígeno activo

Tutorial realizado por:



Dra. Covadonga Rodríguez



Dra. Ana Galindo



Dr. Manuel Marrero



Dr. José A. Pérez



Dra. Deiene Rodríguez



Dra. Diana B. Reis



Jesús Villora



Nieves G. Acosta