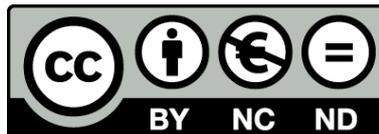




UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Formación de oxiesteroles en el huevo en polvo durante el proceso de atomización y el almacenamiento

Francesc Guardiola Ibarz



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – SinObraDerivada 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 4.0. Spain License.**

87
P.N.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FISIOLÓGICAS HUMANAS Y
DE LA NUTRICIÓN - UNIVERSIDAD DE BARCELONA.

Programa de Doctorado (bienio 89-91): "Nutrición, Tecnología
e Higiene de los Alimentos."

FORMACIÓN DE OXIESTEROLES EN EL HUEVO EN POLVO DURANTE EL PROCESO DE ATOMIZACION Y EL ALMACENAMIENTO.

Memoria presentada por Francesc Guardiola Ibarz para optar
al Grado de Doctor en Farmacia.



DIRECTORES:
Dr. Josep Boatella Riera
Dr. Rafael Codony Salcedo

TUTOR:
Dra. Magdalena Rafecas Martínez

Barcelona, junio 1994.



7

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

3.1 COMPROBACIÓN DE LA NO OXIDACIÓN DEL COLESTEROL A LO LARGO DEL MÉTODO ANALÍTICO

La etapa de saponificación en la determinación del colesterol desde siempre ha sido controvertida por la posibilidad de que implique la formación de derivados oxidados del colesterol, de ahí, la multitud de modificaciones propuestas por diferentes autores con la finalidad de evitar la oxidación durante esta etapa. Estas modificaciones consisten básicamente en: variaciones en el tiempo y temperatura de saponificación; presencia o no de antioxidante; y tipo de antioxidante (Beyer y Jensen, 1989; Bohac *et al.*, 1988; Thompson y Merola, 1993; Ulberth y Reich, 1992; apartado II.D.3.1., páginas 107-108). Este problema en el método utilizado por nosotros no existe, ya que se comprobó que la saponificación a temperatura ambiente durante 20 hr, al amparo de la luz, no produce oxidación alguna sobre la molécula de colesterol (apartado IV.B.3.1.1., páginas 254-255). No obstante, algunos trabajos recientes contemplan los métodos que utilizan la saponificación en caliente como métodos exactos (Littmann-Nienstedt, 1993; Thompson y Merola, 1993).

3.2. CARACTERIZACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO.

Para caracterizar este método se comprobó su selectividad y se determinó su linealidad, precisión y recuperación. Los límites de detección y cuantificación no fueron determinados debido a que el colesterol se encuentra en el huevo en elevadas proporciones y estos dos límites son especialmente útiles en la caracterización de métodos destinados al análisis de trazas.

3.2.1. SELECTIVIDAD DEL MÉTODO.

La selectividad del método se comprobó utilizando el programa de temperatura número 1, esta comprobación se realizó, teniendo en cuenta que el colesterol es el componente mayoritario de la fracción insaponificable del huevo, mediante diluciones crecientes de esta fracción. En la parte superior de la figura 1, podemos observar el cromatograma

correspondiente a disolver el insaponificable completo en 50 μ l de piridina, silanizarlo e inyectarlo (25 μ g de PI), mientras que en la parte inferior se muestra el cromatograma obtenido tras disolver el insaponificable en 5 ml de piridina y operar según se ha detallado durante la descripción de la determinación cromatográfica (2.5 mg de PI). En esta figura podemos observar que la dilución favorece la selectividad, al obtener con ella un pico de colesterol mucho más estrecho al que no se le suman una serie de picos correspondientes a compuestos con tiempo de retención similar.

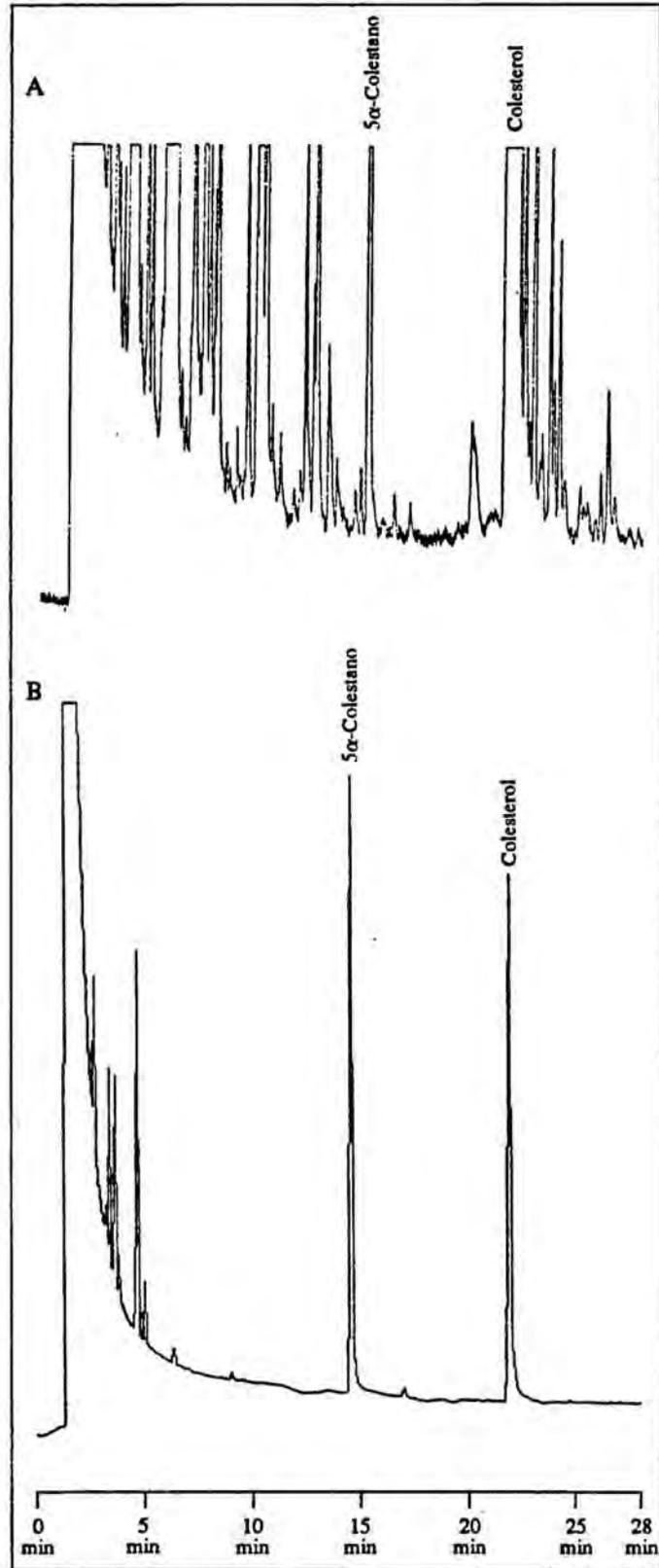


Figura 1-Cromatograma del insaponificable silanizado de huevo. (A) Sin diluir .(B) Diluido.

El cromatograma de la parte inferior es el que corresponde a la dilución que finalmente fue utilizada. Como podemos observar, es extremadamente nítido y prácticamente sólo aparecen los picos del 5 α -colestano y del colesterol.

Para comprobar la selectividad del método se utilizó el programa número 1, porque al trabajar a temperaturas más bajas que el número 2 nos proporcionaba una mejor separación cromatográfica, lo que facilitó la comprobación de la selectividad del método analítico.

3.2.2. LINEALIDAD DE LA RESPUESTA Y FACTOR DE RESPUESTA RELATIVO DEL COLESTEROL FRENTE AL DETECTOR DE IONIZACIÓN DE LLAMA.

La linealidad de la respuesta del colesterol frente al detector de ionización de llama (DIL) se comprobó mediante una recta de calibrado para este compuesto. La recta constó de 7 niveles y de 4 repeticiones para cada nivel. Los pesos en μg de colesterol utilizados en cada uno de los 7 niveles fueron: 5, 10, 20, 30, 40, 50 y 60. El peso de patrón interno (5 α -colestano) empleado fue de 25 μg . Estos pesos de patrones se disolvieron en 50 μl de piridina, sobre la disolución se añadieron 50 μl de agente silanzante (Sylon BTZ), se dejaron transcurrir 20 minutos a temperatura ambiente y se inyectó la mezcla silanzada.

Con los cromatogramas obtenidos se calculó la ecuación de la recta de calibrado del colesterol que vino dada por la recta de regresión de y (A_c/A_{pi}) sobre x (P_c/P_{pi}), con fórmula $y = a + bx$. El coeficiente de determinación (r^2) de esta recta expresa la linealidad de la respuesta, además, a partir de esta recta se calculó el factor de respuesta relativo (FRR) del colesterol según la fórmula siguiente:

$$\text{FRR} = \frac{P_c A_{pi}}{A_c P_{pi}}$$

P_c = peso patrón colesterol;

P_{pi} = peso patrón interno;

A_c = área patrón colesterol;

A_{pi} = área patrón interno.

Esta recta presentó una ordenada en el origen ($a = -0.0681$), una pendiente ($b = 1.3957$) y una $r^2 = 0.9992$. El valor medio ($n = 28$) del FRR del colesterol fue de 0.7764 con un CV (%) de 8.17.

3.2.3.DETERMINACIÓN DE LA PRECISIÓN.

La precisión intralaboratorio de este método se determinó realizando un total de 10 determinaciones sobre una muestra de huevo fresco. Los análisis fueron efectuados por un único analista, en el mismo laboratorio, en días sucesivos y empleando el mismo material y reactivos para todos ellos.

Los resultados de cada una de las 10 determinaciones, así como su valor medio y CV figuran en la tabla 10.

Tabla 10-Precisión del método.

Repetición	Colesterol ^a
1	390.19
2	379.94
3	380.35
4	381.56
5	391.76
6	389.78
7	383.31
8	384.39
9	376.64
10	390.61
$\bar{X} =$	384.85
CV(%) ^b =	1.39

^a Colesterol en mg por 100 g de huevo (fracción comestible).

^b Coeficiente de variación en tanto por ciento.

Los resultados de la tabla 10, con un CV(%) = 1.39, indican que el método presenta una buena precisión.

3.2.4.RECUPERACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO.

Para determinar la recuperación del método, sobre 0.6 g de la muestra de huevo fresco utilizada para la determinación de la precisión, se añadieron por quintuplicado 2.4, 3 y 3.6 mg de patrón de colesterol. Se eligieron estos tres niveles de adición ya que según la bibliografía consultada la mayoría de autores sitúan el contenido de colesterol en huevo entre los 400 y 600 mg por 100 g de fracción comestible y, según esto, 2.4 mg sería el contenido de colesterol en 0.6 g de huevo si éste tuviera 400 mg/100 g y 3.6 mg si tuviera 600 mg/100 g.

Los resultados de recuperación para los tres niveles de adición figuran en la tabla 11.

Tabla 11-Recuperaciones del colesterol a 3 niveles de adición.

Nivel adición	Recuperación
2.4	60.79
2.4	70.25
2.4	67.48
2.4	64.78
2.4	69.48
$\bar{X}_{2.4} =$	66.56
$CV(\%)^a =$	5.79
3	67.63
3	66.30
3	54.62
3	62.78
3	59.79
$\bar{X}_3 =$	62.22
$CV(\%) =$	8.42
3.6	61.33
3.6	60.71
3.6	62.61
3.6	65.18
3.6	62.14
$\bar{X}_{3.6} =$	62.40
$CV(\%) =$	2.76
$\bar{X}_G^b =$	63.73
$CV(\%) =$	6.52

^a Coeficiente de variación en tanto por ciento.

^b Media global (n =15).

En esta última tabla se observa que existen diferencias entre las recuperaciones medias del colesterol a los diferentes niveles de adición. Para saber si estas diferencias eran estadísticamente significativas, se aplicó el análisis de la variancia para grupos independientes en función del nivel de adición. De la aplicación de este análisis se dedujo que las diferencias existentes entre las recuperaciones medias a los diferentes niveles de adición no eran estadísticamente significativas y, de esta forma, se consideró una media global, que agrupaba los resultados de recuperación a los diferentes niveles de adición. Esta recuperación fue la que se aplicó para calcular el contenido de colesterol en las diferentes muestras analizadas.

3.3. CONTENIDO DE COLESTEROL EN EL HUEVO

Los resultados de las 16 muestras de huevo analizadas figuran en la tabla 12, las 10 primeras muestras son de huevo fresco, mientras que las últimas son de huevo congelado. En esta tabla podemos observar que el contenido medio de colesterol expresado en mg por 100 g de fracción comestible es de 392.34, un valor bastante inferior respecto a la mayoría de datos publicados, pero concordante con algunos de los contenidos recientemente difundidos (Beyer y Jensen, 1989; Scherz y Senser, 1989). Esta observación está en relación con el hecho constatado de que los métodos colorimétricos y enzimáticos, ampliamente utilizados, aunque en recesión actualmente, presentan baja selectividad en comparación con los métodos cromatográficos (Beyer y Jensen, 1989; Bohac *et al.*, 1988; Ulbert y Reich, 1992). Concretamente, Beyer y Jensen estimaron que la determinación colorimétrica del colesterol en el huevo implicaba una sobrestimación del contenido de este compuesto de entre un 26% y un 46%, respecto a su determinación por CLAE.

Tabla 12-Contenido de colesterol en huevo expresado en mg por 100 g de fracción comestible

Muestra	Colesterol
1	384.85
2	404.07
3	383.11
4	415.05
5	387.86
6	380.01
7	423.06
8	372.43
9	387.56
10	378.12
11	391.21
12	388.36
13	399.11
14	398.71
15	390.27
16	393.59
\bar{X}	392.34
CV(%) ^a =	3.38

^a Coeficiente de variación en tanto por ciento.

4. BIBLIOGRAFÍA.

Armstrong, B.K., Mann, J.I., Adelstein, A.M. y Eskin, F. (1975). Commodity consumption and ischaemic heart disease mortality, with special reference to dietary practices. *J. Chron. Dis.* **28**, 455-469.

Berner, Y., M. Bar-El, B. Habet and M. Shinitzky. (1991). Consumption of two eggs per day does not increase serum cholesterol in the elderly. En *Quality of poultry products II. Eggs and egg products* (A. Oosterwoud and A.W. de Vries, Ed., procedente del "4th European Symposium on the quality of eggs and egg products"). p. 91-95. Spelderholt centre for poultry research and information services, Beekbergen, Holanda.

- Beyer, R.S. y Jensen, L.S. (1989). Overestimation of the cholesterol content of eggs. *J. Agric. Food Chem.* **37**, 917-920.
- Bohac, C.E., Rhee, K.S., Cross, H.R. y Ono, K. (1988). Assessment of methodologies for colorimetric cholesterol assay of meats. *J. Food Sci.* **53**, 1642-1446, 1693.
- Edington, J.D., Geekie, M. y Carter, R. (1987). Effect of dietary cholesterol on plasma cholesterol concentration in subjects following reduced fat, high fiber diet. *Br. Med. J.* **294**, 333-336.
- European Atherosclerosis Society. (1987). Strategies for the prevention of coronary heart diseases: a policy statement of European Atherosclerosis Society. *Eur. Heart J.* **8**, 77-88.
- Folch, J., Lees, M. y Sloane Stanley, G.H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **226**, 497-509.
- Kestin, M., Clifton, P.M., Rouse, I.L. y Nestel, P.J. (1989). Effect of dietary cholesterol in normolipidemic subjects is not modified by nature and amount of dietary fat. *Am. J. Clin. Nutr.* **50**, 528-532.
- Keys, A., Menotti, A., Karvonen, M.J. y Aravanis, C. (1986). The diet and 15-year death rate in the seven countries study. *Am. J. Epidemiol* **124**, 903-915.
- López, S.H., Krehl, W.A., Hodges, R.E. y Good, E.L. (1966). Relationship between food consumption and mortality from atherosclerosis heart disease in Europe. *Am. J. Clin. Nutr.* **19**, 361.
- Marshall, M.W., Clevidence, B.A., Thompson, R.H. y Judd, J.T. (1989). Problems in estimating amounts of food cholesterol: three methods of mixed diets. *J. Food Comp. Anal.* **2**, 2-12.
- Masironi, F. (1970). Dietary factors and coronary heart disease. *Bull. WHO* **42**, 103.
- McNamara, D.J. (1990). Dietary cholesterol: effects on lipid metabolism. *Current Opinion Lipidology* **1**, 18-22.
- National Institute of Health. (1985). Consensus development conference statement. Lowering blood cholesterol to prevent heart disease. *J.A.M.A.* **254**, 2080-2090.
- OCDE. (1988). *Food Consumption Statistics 1976-1985*. Service des publications de l'Organisation pour la Coopération et Développement Économique, París, Francia.
- Oh, S.Y. y Miller, L.T. (1985). Effect of dietary egg on variability of plasma cholesterol levels and lipoprotein cholesterol. *Am. J. Clin. Nutr.* **42**, 421-431.
- OMS. (1982). *Prevention of coronary heart disease*. Informe de un comité de expertos de la OMS. World Health Organisation technical report Series, 678, OMS, Ginebra, Suiza.

- Park, S.W. y Addis, P.B. (1985). Capillary column gas-liquid chromatographic resolution of oxidized cholesterol derivatives. *Anal. Biochem.* **149**, 275-283.
- Park, S.W. y Addis, P.B. (1986). Identification and quantitative estimation of oxidized cholesterol derivatives in heated tallow. *J. Agric. Food Chem.* **34**, 653-659.
- Pyörälä, K. (1987). Dietary cholesterol in relation to plasma cholesterol and coronary heart disease. *Am. J. Clin. Nutr.* **45**, 1176-1184.
- Richardson, D.I.S. (1992). Situation and trends in egg international industry. *Int. Egg Market Rev.* **49**, 1-4 y 26-27.
- Scherz, H. y Senser, F. (1989). Souci, Fachmann and Kraut *Food composition and nutrition tables 1989/90*. p. 124-126. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft GmbH, Stuttgart, Alemania.
- Schonfeld, G., Patsch, W., Ridel, L.L., Nelson, C., Epstein, M. y Olson, R.E. (1982). Effects of dietary cholesterol and fatty acids on plasma lipoproteins. *J. Clin. Invest.* **69**, 1072-1080.
- Stamler, J., Stamler, R. y Shekelle, R.B. (1970). Regional differences in prevalence, incidence and mortality from atherosclerotic coronary heart disease. En *Ischemic Heart Disease* (J.H. de Haas, H.C. Hemker y H.A. Snellen, Ed.). p. 84. Leiden University Press, Leiden, Holanda.
- Thompson, R.H. y Merola, G.V. (1993). A simplified alternative to the AOAC official method for cholesterol in multicomponent foods. *J. AOAC* **76**, 1057-1068.
- Ulberth, F. y Reich, H. (1992). Gas chromatographic determination of cholesterol in processed foods. *Food Chem.* **43**, 387-391.
- Ulbricht, T.L.V. y Southgate, D.A.T. (1991). Coronary heart disease: seven dietary factors. *Lancet* **338**, 985-992.

IV.B. PUESTA A PUNTO DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE OXIESTEROLES EN HUEVO EN POLVO.

1. INTRODUCCIÓN.	231
2. MATERIAL Y MÉTODOS.	231
1. Muestras.	231
2. Material y reactivos.	231
3. Patrones.	232
4. Elección del patrón interno.	233
5. Descripción de los métodos ensayados para la determinación de oxiesteroles.	234
1. Extracción de la fracción lipídica.	236
2. Saponificación en frío.. . . .	237
3. Purificación con el cartucho de gel de sílice.	238
4. Silanización y determinación cromatográfica.. . . .	238
6. Identificación de los picos.	243
1. Identificación por espectrometría de masas.	245
3. MEJORA, CARACTERIZACIÓN Y COMPARACIÓN DE TRES MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE OXIESTEROLES.	254
1. Pruebas previas.	254
1. Comprobación de que no se produce oxidación del colesterol durante la aplicación de los métodos analíticos.	254
2. Ensayo de eliminación de las impurezas con elevado tiempo de retención.	255
3. Influencia del material constituyente del microtubo de silanización.	257
1. Estudio de la adsorción de los oxiesteroles en los microtubos de silanización de diferentes materiales.	257
2. Estudio de la influencia del material constituyente del microtubo de silanización sobre los valores de A_{px}/A_{pi}	259
3. Conclusiones relacionadas con el uso de microtubos de silanización de diferentes materiales.	262

4. Recuperación del colesterol y oxистерoles a través del cartucho de gel de sílice: utilización de diferentes disolventes para su elución.	262
5. Recuperación de los oxистерoles y de algunos esteroles vegetales a través del cartucho de gel de sílice con la elución número 4.	277
2. Caracterización y comparación de los métodos analíticos.	280
1. Linealidad de la respuesta y factores de respuesta relativos del colesterol y los oxистерoles frente al detector de ionización de llama con diferentes patrones internos.	280
2. Comparación de los tres métodos analíticos: estudio de su precisión y recuperación para la determinación de oxистерoles.	285
1. Determinación de la precisión.	286
2. Determinación de la recuperación.	291
3. Ensayos para la mejora de la precisión y recuperación.	297
3. Límites de detección y cuantificación cromatográfica de los diferentes oxистерoles.	315
4. BIBLIOGRAFÍA	324

1.INTRODUCCIÓN.

La falta de trabajos en los que se comparasen distintos métodos de análisis de OE nos llevó a planteamos un estudio comparativo entre 3 metodologías para la determinación de estos compuestos. De estos tres métodos, los dos primeros (método 1 y método 2) fueron extraídos de entre los más utilizados para este análisis, según la bibliografía consultada, mientras que el tercero, en cambio, fue producto de una fusión entre estos dos métodos anteriores, propuesta por nosotros (método 3).

Además de la comparación entre estos tres métodos, mediante la determinación de su precisión y recuperación, en este estudio se pretendió mejorar y caracterizar cada uno de estos métodos, con el fin de elegir, posteriormente, el más fiable de los tres para la determinación de OE.

2.MATERIAL Y MÉTODOS.

2.1.MUESTRAS.

Para todo este estudio se utilizó una única muestra comercial de huevo en polvo obtenida por atomización.

2.2.MATERIAL Y REACTIVOS.

Los diferentes disolventes utilizados fueron de la calidad y procedencia que se indican a continuación: el cloroformo (ACS), el metanol (ACS), el éter dietílico (ACS), la acetona (ACS) y el hexano (mezcla de alcanos, para análisis) fueron comprados a Panreac, Montplet & Esteban (Barcelona, España); y el acetato de etilo (ACS) y la piridina desecada (máximo 0.01% de agua, para análisis) a Merck (Darmstadt, Alemania).

El resto de reactivos utilizados poseían la calidad y procedencia siguientes: El hidróxido sódico y el sulfato sódico anhidro (ambos para análisis) fueron suministrados por Panreac;

y el Sylon BTZ (N,O-bis(trimetilsilil)acetamida/trimetilclorosilano/N-trimetilsililimidazol, 3:2:3, para investigación) en ampollas selladas de 0.1 ml por Supelco, Inc. (Bellefonte, PA).

Los cartuchos de gel de sílice (Sep-Pak cartridges, ref. 51900, Waters, división de Millipore, Milford, MA).

2.3.PATRONES.

La mayoría de los patrones empleados fueron proporcionados por Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) y presentaron las siguientes purezas determinadas mediante diferentes técnicas cromatográficas: colesterol-5 α ,6 α -epóxido del 99 % (5,6 α -epoxi-5 α -colestano-3 β -ol¹, por CCF²), el 7 β -hidroxicolesterol del > 99 % (colest-5-en-3 β ,7 β -diol, por CCF), el colestatriol del > 97 % (5 α -colestano-3 β ,5,6 β -triol, por CG), el 7-cetocolesterol del > 99 % (3 β -hidroxicolest-5-en-7-ona, por CLAE), el 25-hidroxicolesterol del > 98 % (colest-5-en-3 β ,25-diol, por CCF), la 11 α -hidroxiprogesterona del > 98 % (11 α -hidroxipregn-4-en-3,20-diona, por CG), la 11 β ,17 α -dihidroxiprogesterona del 99 % (11 β ,17 α -dihidroxipregn-4-en-3,20-diona, por CLAE), el 19-hidroxicolesterol del > 99 % (colest-5-en-3 β ,19-diol, CCF), el 6-cetocolestanol del > 99 % (3 β -hidroxi-5 α -colestano-6-ona, por CG), β -sitosterol del 95 % (estigmast-5-en-3 β -ol, por CG) y el estigmasterol del 96 % (estigmasta-5,22-dien-3 β -ol, por CG).

Los únicos patrones no suministrados por Sigma fueron: el colesterol (colest-5-en-3 β -ol), Merck, para fines bioquímicos y con una pureza >99% (por CG); y el 5 α -colestano, Supelco, con una pureza 99% (por CG).

¹ Nombre sistemático.

² Técnica cromatográfica por la que se determinó la pureza.

Todos estos patrones se pesaron en una balanza Sartorius, modelo 2004 MP, que permitía apreciar hasta la centésima de mg. De estos patrones, para su manipulación, se prepararon disoluciones en acetato de etilo de concentración 2.5 mg/10 ml para los que fueron utilizados como patrón interno (PI) y de 2 mg/10 ml para el resto. Estas soluciones una vez preparadas se conservaron, un máximo de dos meses, encapsuladas en viales de color topacio a - 20 °C. Las diluciones que fue necesario preparar a partir de estas soluciones se realizaron en el momento de su uso, también con acetato de etilo.

2.4.ELECCIÓN DEL PATRÓN INTERNO.

Inicialmente, se utilizó como PI el 5 α -colestano. Este patrón no se recuperaba a través del cartucho de gel de sílice y se añadía al final de los 3 métodos ensayados, justo antes de la silanización. Posteriormente, se busco, para intentar mejorar la precisión, un patrón interno que se recuperara a través del cartucho de gel de sílice y se pudiera añadir al principio de los métodos ensayados. Bibliográficamente se vio que el 6-cetocolestanol utilizado por Missler *et al.* (1985), como PI, presumiblemente se recuperaría a través del cartucho de gel sílice, pues, se recuperó a través de una columna rellena de esta misma fase estacionaria. Por otro lado, Morgan y Armstrong en un trabajo de 1989 utilizaron un método para la determinación de OE, en donde se utilizaba el mismo cartucho de gel de sílice que en nuestro estudio y la 7-cetopregnenolona (3 β -hidroxipregn-5-en-7,20-diona), añadida al principio del método, como PI. Basándonos en esta información se ensayaron 4 compuestos como posibles PI, que fueron: la 11 α -hidroxiprogesterona, la 11 β ,17 α -dihidroxiprogesterona, el 19-hidroxicolesterol (19-HC) y el 6-cetocolestanol. Los 2 primeros de estos patrones fueron descartados, al inyectarlos en el cromatógrafo de gases, por presentar cromatogramas con un pico mayoritario acompañado de varios minoritarios, mientras que el último lo fue por presentar un TR muy cercano al del CT, hasta el punto de solaparse ampliamente con él (teniendo en cuenta que se trabajaba en el cromatógrafo de gases con el programa de temperatura 2 detallado en el apartado 2.5.4, página 238). De este modo, el 19-HC que no presentaba ninguno de estos 2 problemas quedó como único posible patrón interno. A continuación, se comprobó que este patrón se recuperaba a través del cartucho de gel de sílice, por lo cual se eligió definitivamente como PI. Posteriormente, en una revisión bibliográfica más amplia se vio que este compuesto ya había sido utilizado como PI por Pie

et al. (1990), en un método en el cual se añadía al principio y los OE se determinaban por CG tras la purificación del extracto lipídico por saponificación y posterior CCF con placa de gel de sílice. En esta misma revisión se observó que, Nawar *et al.*, en 1991, utilizaron el acetato de epiandrosterona (acetato de 3 β -hidroxi-5 α -androstan-17-ona) como PI, añadido al principio, en un método para la determinación de OE por CG en el cual la purificación del extracto lipídico se realizaba mediante una minicolumna de gel de sílice.

2.5. DESCRIPCIÓN DE LOS MÉTODOS ENSAYADOS PARA LA DETERMINACIÓN DE OXIESTEROLES.

Como ya se ha comentado anteriormente, en este trabajo se compararon 3 métodos analíticos para la determinación de OE, dos de los cuales fueron extraídos de la bibliografía consultada (método 1 y método 2).

El **método 1** ha sido ampliamente utilizado en estos últimos años y consiste en una extracción de la fracción lipídica por agitación con cloroformo/metanol (2:1, v/v), una posterior saponificación en frío con potasa metanólica de esta fracción, la extracción de la fracción insaponificable con éter dietílico, la silanización del insaponificable donde se encuentran los OE y la determinación de los OE por CG. Este método 1, según la bibliografía consultada, fue introducido por Park y Addis (1986a) para determinar OE en sebos calentados, más tarde, en 1987, estos mismos autores utilizaron este método para la determinación de OE en carnes. Este método, con pequeñas modificaciones en algunos casos, ha sido recientemente utilizado por diversos autores en la determinación de OE en diferentes alimentos y en plasma (Emanuel *et al.*, 1991; Park y Addis, 1986b; Sander *et al.*, 1988, 1989; Yan y White, 1990; Zhang y Addis, 1990; Zhang *et al.*, 1991). En algunos trabajos recientes, tras la saponificación en frío y de forma previa a la silanización, se realiza una cromatografía en capa fina (CCF) con placa de gel de sílice para completar la purificación (Pie *et al.*, 1990, 1991; Pie y Seillan, 1992). No obstante, cabe tener en cuenta que la saponificación en frío en la determinación de OE fue ya introducida durante los años 60 por Williams y Pearson (1966) y Chicoye *et al.* (1968). Además, Chicoye *et al.* ya combinaron esta saponificación con la CCF con placa de gel de sílice, en un método que en el resto de características no se parecía al empleado por Pie y sus colaboradores en los 3 trabajos citados anteriormente.

Por otro lado, el **método 2**, que consiste en una extracción de la fracción lipídica por agitación con cloroformo/metanol (2:1, v/v), una posterior purificación de los OE presentes en esta fracción mediante su elución a través de un cartucho de gel de sílice, la silanización de la fracción purificada y la determinación de los OE por CG, también ha sido utilizado recientemente para la determinación de OE en ovoproductos por Morgan y Armstrong (1989, 1992). Morgan y Armstrong (1987) ya habían utilizado el cartucho de gel de sílice para la determinación de epoxicolesteroles (α -CE y β -CE), sin silanización y por CG, en yema de huevo en polvo. Además de estos métodos en los que se utiliza propiamente el cartucho de gel de sílice (Sep-Pak cartridge), existen otros métodos de determinación de OE por CG, con o sin silanización, en los que se utilizan minicolumnas de gel de sílice, perfectamente asimilables a estos cartuchos (De Vore, 1988; Hwang y Maerker 1993; Nawar *et al.*, 1991; Tsai y Hudson, 1985; Tsai *et al.*, 1980). Por otro lado, los cartuchos de gel de sílice propiamente dichos también son utilizados en distintos trabajos de Nourooz-Zadeh y Appelqvist (1988a, b, 1989), en donde constituyen una más de las etapas de la compleja purificación de los OE utilizada por estos autores. Referente a este método, cabe destacar que la polaridad de los disolventes utilizados para la elución del cartucho de gel de sílice, como veremos en el apartado 3.1.4., páginas 262-277, determina el hecho de que los diferentes OE eluyan a través de este cartucho o queden retenidos en él. En este apartado se comparan 4 secuencias diferentes de elución de los OE a través del cartucho de sílice y se selecciona la mejor de ellas, basándonos en los resultados de recuperación para los diferentes OE ensayados. La secuencia elegida resultó ser la número 4 que había sido modificada por nosotros a partir de la propuesta por Morgan y Armstrong (1989).

El **método 3** es producto de una fusión entre los 2 anteriores y consiste en la extracción de la fracción lipídica por agitación con cloroformo/metanol (2:1, v/v), la saponificación en frío con potasa metanólica de esta fracción, la extracción de la fracción insaponificable con éter dietílico, la purificación de los OE existentes en el insaponificable mediante su elución a través de un cartucho de gel de sílice, la silanización de la fracción purificada y la determinación de los OE por CG.

De esta forma, los 3 métodos comparados poseen unas etapas inicial (la extracción de la fracción lipídica) y final (la determinación cromatográfica, incluyendo la silanización)

comunes. También resulta común a los 3 métodos el hecho de trabajar en condiciones de luz atenuada. La descripción detallada de cada una de las fases comunes y no comunes de los 3 métodos es la que sigue, presentándose además un esquema de los 3 métodos en las figuras 1, 2 y 3.

2.5.1. EXTRACCIÓN DE LA FRACCIÓN LIPÍDICA (común a los 3 métodos).

La extracción se realizó mediante el protocolo descrito a continuación, basado en el método de Folch *et al.* (1957). Entre 0.45 y 0.65 g de huevo en polvo fueron pesados exactamente en un Erlenmeyer de 25 ml de capacidad y sobre ellos se añadieron 25 μ g de patrón interno¹ (19-HC) y 15 ml de la mezcla cloroformo/metanol (2:1, v/v). El conjunto se sometió a agitación magnética durante 30 minutos. A continuación, se decantó el líquido sobre un embudo con papel de filtro, recogiendo el filtrado sobre un tubo con tapón de rosca y junta de teflón (26 x 100). Tras ello, el residuo presente en el Erlenmeyer se reextrajo con 10 ml de cloroformo/metanol (2:1, v/v) durante 10 minutos. A continuación se filtró la mezcla y se lavó el Erlenmeyer y el residuo del papel de filtro con 5 ml más de la mezcla de disolventes. Estas dos últimas fracciones de filtrado se recogieron sobre el mismo tubo que la anterior y sobre ellas se añadieron 5 ml de agua destilada. El tubo se tapó, se agitó y se centrifugó a 2200 rpm durante 20 minutos. La fase inferior se transfirió mediante una pipeta Pasteur a un matraz de fondo redondo de color topacio, en el caso del método 2 esta transferencia se hizo a través de sulfato sódico anhidro. Se concentró el extracto hasta aproximadamente 1 ml mediante un evaporador rotatorio de vacío, a una temperatura de 35 °C. Las últimas fracciones de disolvente se eliminaron mediante corriente de nitrógeno y a continuación en un desecador con la aplicación de vacío creciente. Después de 30 minutos (para los métodos 1 y 3) y de 1 hora (para el método 2) en el desecador con un vacío de 750 mm Hg se obtuvo un extracto lipídico.

¹ Cuando se utiliza 19-HC como PI se añade en este punto, en cambio cuando se utiliza el 5 α -colestano se añade justo antes de la silanización.

2.5.2.SAPONIFICACIÓN EN FRÍO (métodos 1 y 3).

La saponificación se realizó mediante el protocolo descrito a continuación, basado en el método de Park y Addis (1986a). Sobre el extracto lipídico se añadieron 10 ml de potasa metanólica 1N y se agitó suavemente el matraz hasta conseguir una única fase homogénea, una vez hecho esto se dejaron transcurrir 20 hr a temperatura ambiente desde la adición de la potasa. Transcurrido este tiempo, la mezcla se pasó cuantitativamente a un tubo (26 x 100) mediante 10 ml de éter etílico y 10 ml de agua destilada. El tubo se tapó, se agitó y una vez separadas las dos fases, la fase etérea superior se pasó a un embudo de decantación mediante una pipeta Pasteur. La fase inferior se reextrajo de forma análoga con 2 fracciones más de 10 ml de éter etílico. Las 2 fracciones etéreas se reunieron con la anterior en el embudo de decantación y se lavaron, sucesivamente, con 5 ml de potasa acuosa 0.5 N y 2 fracciones de 5 ml de agua destilada. La solución etérea se filtró sobre sulfato sódico anhidro y se recogió en un matraz de fondo redondo, lavándose el sulfato con pequeños volúmenes del disolvente que también se recogieron sobre el matraz. Se concentró el extracto hasta aproximadamente 1 ml mediante un evaporador rotatorio de vacío, a una temperatura de 30 °C. Llegados a este punto, se opera de forma diferente para el método 1 que para el 3. Para el método 1, el concentrado del extracto se transfirió cuantitativamente con la ayuda de pequeñas fracciones de éter etílico a un tubo de vidrio Pyrex (10 x 75) que contenía 25 µg de 5α-colestano¹. El disolvente se dejó evaporar, parcialmente, bajo campana, pero las últimas fracciones de éste se eliminaron mediante leve corriente de nitrógeno, calentando a 25 °C, y, a continuación, en un desecador con la aplicación de vacío creciente. Después de 1 hora en el desecador con un vacío de 750 mm Hg se procedió a la silanización y posterior determinación cromatográfica (apartado 2.5.4., páginas 238-239). Para el método 3, las últimas fracciones de disolvente presentes en el matraz de fondo redondo se eliminaron mediante una leve corriente de nitrógeno y, a continuación, en un desecador con la aplicación de vacío creciente. Después de 30 minutos en el desecador con un vacío de 750 mm Hg, se obtuvo la fracción insaponificable seca.

¹ Cuando se utiliza 19-HC como PI se añade en este punto, en cambio cuando se utiliza el 5α-colestano se añade justo antes de la silanización.

2.5.3. PURIFICACIÓN CON EL CARTUCHO DE GEL DE SÍLICE (métodos 2 y 3).

Se redisolvió el extracto lipídico (método 2) o la fracción insaponificable (método 3) en 5 ml de hexano y se aplicó a un cartucho de gel de sílice (Waters, ref. 51900) previamente activado con 5 ml del mismo disolvente. Se utilizaron 5 ml más de hexano para conseguir el paso cuantitativo de la muestra al cartucho y, a continuación, se eluyó mediante fracciones de polaridad creciente: 10 ml de hexano/éter etílico, 95:5, v/v, también utilizados para completar el paso cuantitativo del insaponificable al cartucho; 30 ml de hexano:éter etílico, 90:10, v/v; 10 ml de hexano/éter etílico, 80:20, v/v; y 10 ml acetona/metanol, 60:20, v/v. La última de estas fracciones, donde se encontraban los OE, fue recogida en un matraz de fondo redondo y concentrada hasta aproximadamente 1 ml por medio de un evaporador rotatorio de vacío. Este concentrado de OE se transfirió cuantitativamente con la ayuda de pequeñas fracciones de éter etílico a un tubo de vidrio Pyrex (10 x 75) con 25 μg de 5α -colestano¹. El disolvente se dejó evaporar, parcialmente, bajo campana, pero las últimas fracciones de éste se eliminaron mediante leve corriente de nitrógeno, calentando a 25 °C, y, a continuación, en un desecador con la aplicación de vacío progresivo. Después de 1 hora en el desecador con un vacío de 750 mm Hg se procedió a la silanización y posterior determinación cromatográfica.

2.5.4. SILANIZACIÓN Y DETERMINACIÓN CROMATOGRÁFICA

(común a los 3 métodos).

El residuo seco del tubo (10 X 75) se redisolvió en 50 μl de piridina y a continuación se añadieron 50 μl del agente silanizante (Sylon BTZ). Esta mezcla se mantuvo durante 20 min a temperatura ambiente y a continuación fue inyectada por duplicado en el cromatógrafo. Para tener la seguridad de que esta reacción sea completa es indispensable evitar la presencia de humedad. Los derivados silanizados permanecen estables a -20 °C durante unos días (Park y Addis, 1985a).

¹ Cuando se utiliza el 5α -colestano como PI se añade en este punto, en cambio cuando se utiliza el 19-HC se añade sobre la muestra de huevo en polvo una vez pesada.

Para las determinaciones cromatográficas se utilizaron dos cromatógrafos Perkin Elmer, modelos Sigma 2000 y Autosystem, equipados con un detector de ionización de llama y una columna capilar de sílice (25 m x 0.25 mm d.i.), con 0.13 μm de espesor de recubrimiento interno de una fase estacionaria de dimetil silicona (CP-Sil 5 CB) de Chrompack (Middelburg, Holanda). Se usó helio como gas portador y las condiciones cromatográficas fueron:

-programas de temperatura de horno:

1) de 210 °C hasta 240 °C a 6 °C/min, de 240°C hasta 270 °C a 4 °C/min, de 270°C hasta 290 °C a 2 °C/min y 5 ó 82 min a 290 °C (usado en el Sigma 2000);

2) de 210 °C hasta 264 °C a 2 °C/min, de 264 °C hasta 290 °C a 5 °C/min y 2 ó 80 min a 290 °C (usado en el Autosystem);

-temperatura del inyector: 290 °C;

-temperatura del detector: 350 °C;

-relación de partición: 1:40 para el Sigma 2000 y 1:30 para el Autosystem;

-presión de entrada: 15 psi;

-volumen inyectado: 2 μl .

Antes de elegir estos programas de temperatura de horno, con el fin de conseguir una buena separación entre los picos de los derivados silanizados (trimetilsilil éteres) de los diferentes OE, se ensayaron con cada cromatógrafo varios programas. La separación entre estos puntos resultó especialmente problemática en el caso de los trimetilsilil éteres del α -CE y 7 β -HC, que presentaban picos con TR muy similares. Con el programa 1 el pico del α -CE presentaba menor TR que el del 7 β -HC y se solapaba ligeramente con él. Con el programa 2 se invertía el orden cromatográfico de estos picos y, aunque todavía se solapaban, la diferencia entre los TR de estos picos, en valor medio, aumentó ligerísimamente respecto a la que se presentaba con el programa 1. Los dos programas presentan dos posibles tiempos de permanencia a la temperatura final de 290 °C, en ambos casos el tiempo corto fue el empleado al trabajar con patrones y el largo al trabajar con muestras. Esto es debido a que las muestras que se inyectan, se hayan obtenido con cualquiera de los tres métodos descritos, presentan impurezas con elevado TR, que hacen necesario un tiempo de purga a 290 °C antes de la inyección de una nueva muestra. Este problema de las impurezas también fue descrito por Van de Bovenkamp *et al.* en un trabajo de 1988, en donde la purga se realizó a 295 °C.

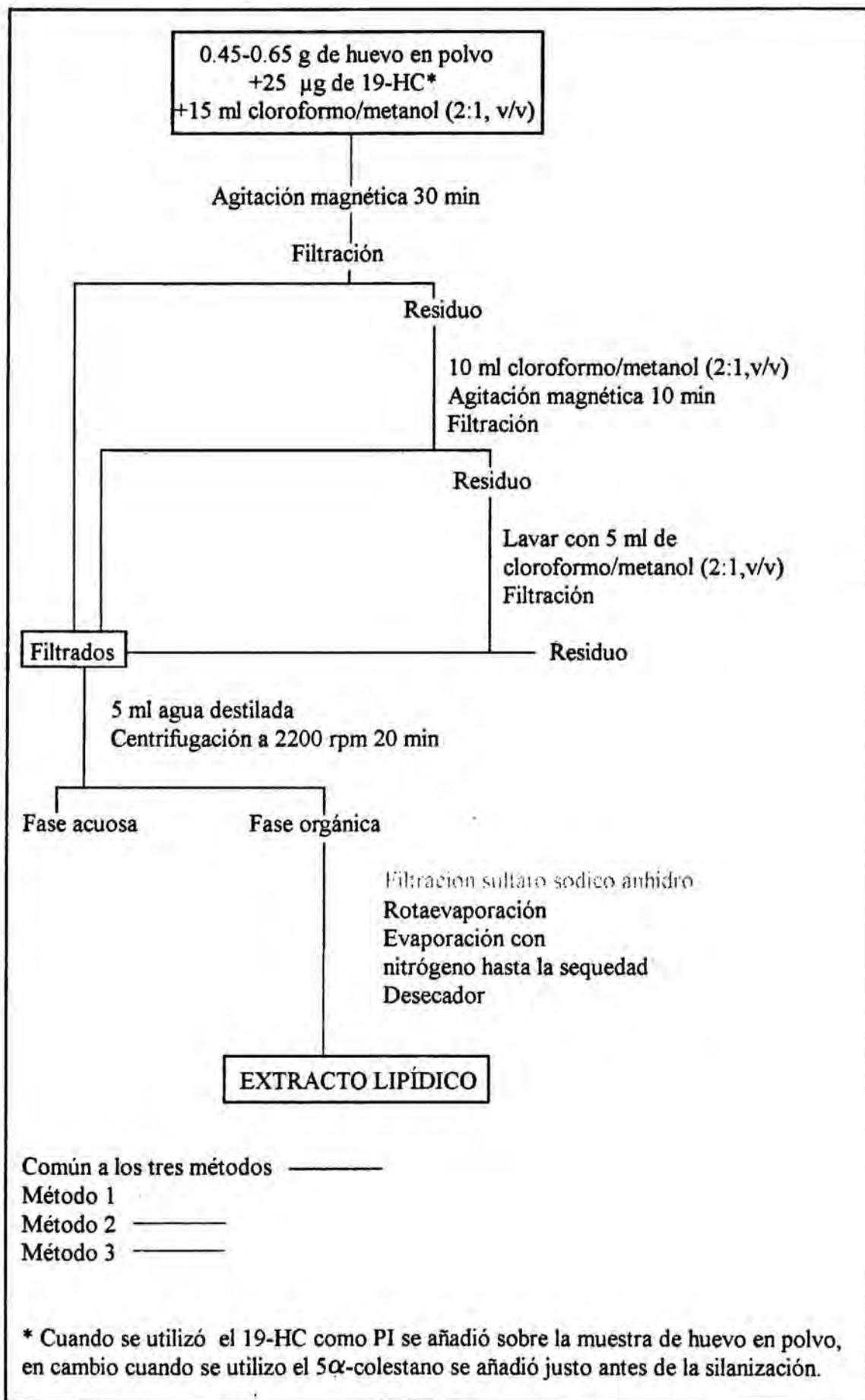


Figura 1-Extracción de la fracción lipídica.

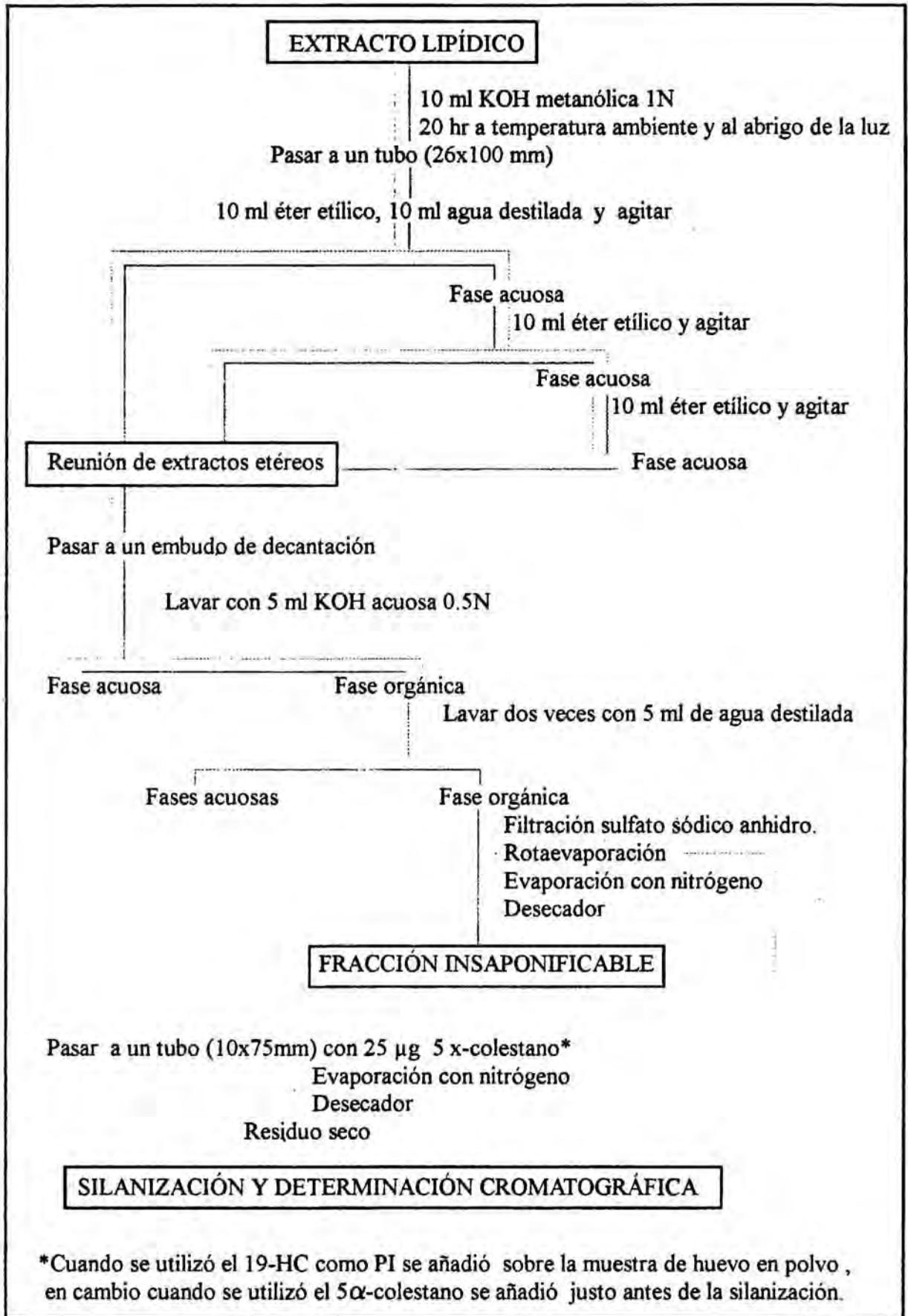


Figura 2-Saponificación.

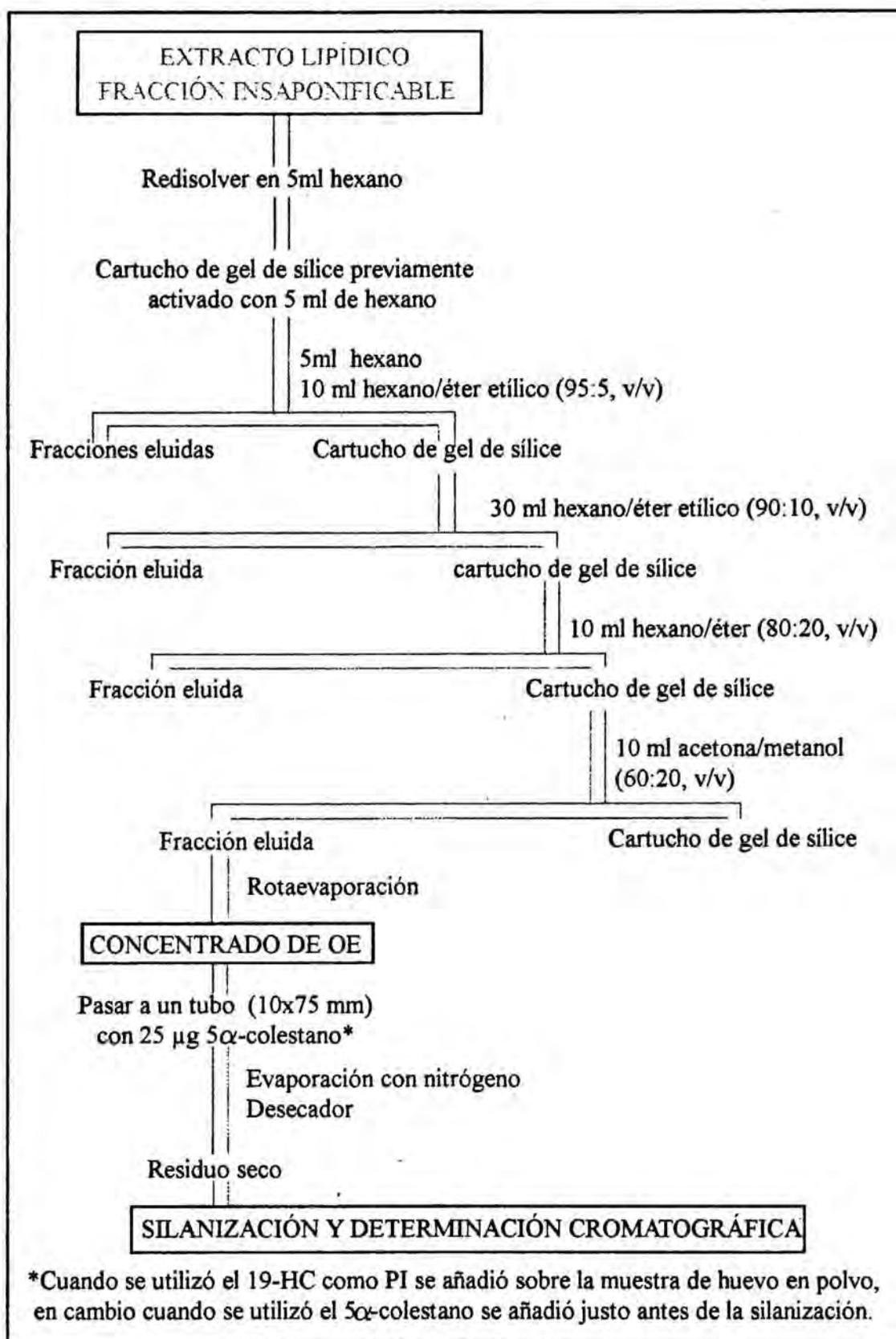


Figura 3-Purificación con el cartucho de gel de sílice.

2.6. IDENTIFICACIÓN DE LOS PICOS.

La identificación de los OE se realizó, en primera instancia, mediante la comparación de los TR relativos de patrones silanizados de estos compuestos con los de los picos de un extracto purificado y silanizado de la muestra de huevo en polvo. Tras ello, se procedió a confirmar la identificación mediante la adición al extracto silanizado de patrones de OE también derivatizados. En el caso de los picos que presumiblemente correspondían al 7 β -HC y 7-CC, previamente a la adición de patrón, se realizó una dilución con piridina del extracto silanizado hasta tener un pico de tamaño similar al que se obtiene al inyectar una solución de 1.2 μ g/100 μ l del correspondiente patrón silanizado. Para todos los presuntos OE la adición se realizó de tal manera que la cantidad de patrón adicionada supusiera un aumento en el área del pico problema de entre un 50-100%. En todos los casos, la mezcla extracto-patrón obtenida se inyectó varias veces en el cromatógrafo de gases, empleando los programas de temperatura de horno descritos en el apartado anterior y los que siguen:

- 1) de 210 °C hasta 290 °C a 6 °C/min y 10 ó 87 min a 290 °C;
- 2) de 210 °C hasta 240 °C a 6 °C/min, de 240 °C hasta 290 °C a 4 °C/min y 7 ó 84 min a 290 °C;
- 3) de 210 °C hasta 240 °C a 6 °C/min, de 240°C hasta 290 °C a 2 °C/min y 2 ó 80 min a 290 °C.

De estos tres programas el último no separaba el α -CE del 7 β -CE y por tanto no fue utilizado para su identificación. Sólo se dio por confirmada la identificación en el caso de que el pico resultante del problema más el patrón fuera simétrico en todos y cada uno de los cromatogramas obtenidos a las distintas condiciones de temperatura ensayadas. En aquellos casos en que se diluyó el extracto fue para trabajar con picos pequeños en los que, cuando el compuesto que da el pico problema no coincide con el patrón adicionado, es más fácil observar asimetría o desdoblamiento. Los picos identificados mediante este sistema son los que podemos observar en la figura 4.

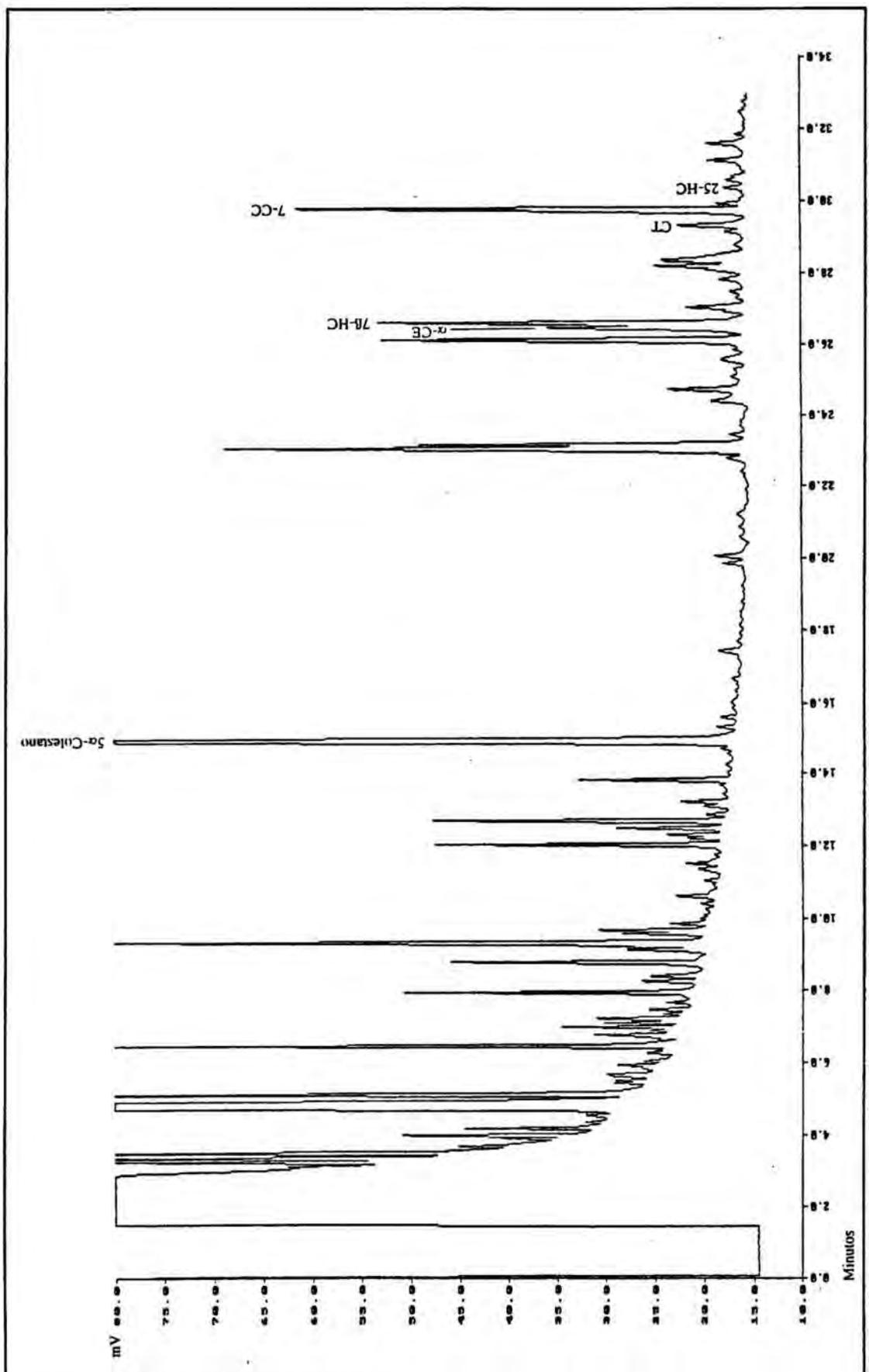


Figura 4-Cromatograma de un extracto silanizado obtenido con el método 3 a partir de la muestra de huevo en polvo (programa temperatura de horno n° 2, ap. 2.5.4., pág. 238).

2.6.1. IDENTIFICACIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS.

Una ulterior confirmación de la identidad de estos picos se realizó por espectrometría de masas. La muestra llegó al espectrómetro de masas Hewlett Packard 5988A, tras su elución en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890 equipado con una columna de sílice (25 m x 0.32 mm d.i.), con 0.52 μm de espesor de recubrimiento de una fase estacionaria de metil silicona de Hewlett Packard (Ginebra, Suiza). El helio fue utilizado como gas portador. Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes:

-programa de temperatura de horno:

2) de 210 °C hasta 264 °C a 2 °C/min, de 264 °C hasta 290 °C a 5 °C/min y 2 ó 80 min a 290 °C;

-temperatura del inyector: 290 °C;

-relación de partición: 1:50;

-presión de entrada: 15 psi;

-volumen inyectado: 5 μl .

Las condiciones de trabajo del espectrofotómetro fueron las siguientes:

-temperatura de la interfase: 280 °C;

-temperatura de la fuente iónica: 200 °C;

-energía del haz de electrones: 70 eV.

Bajo estas condiciones, la identificación se realizó mediante la comparación de los espectros de masas de los picos de la muestra silanizada, que presuntamente pertenecían a los OE, con los espectros obtenidos a partir de la biliografía consultada (tabla 4, página 127) y de la previa inyección de los patrones silanizados de estos compuestos. Se confirmó así la identificación de 5 OE. En la figura 5 podemos ver el cromatograma, producido por el total de iones que llegan en cada momento al detector de masas, correspondiente a un extracto silanizado de la muestra de huevo en polvo. En esta figura podemos apreciar que con esta columna y estas condiciones cromatográficas, los derivados silanizados del 7 β -HC y α -CE se solapaban totalmente. No obstante, se comprobó con patrones que el α -CE eluía con un

ligero retraso respecto al 7 β -HC, así, el pico 1 constituido por estos dos compuestos era más rico en su zona inicial en 7 β -HC y en la final en α -CE, esto permitió la identificación de estos compuestos en la muestra silanizada. En la tabla 1 se recogen los iones característicos de cada patrón con sus intensidades porcentuales respecto al pico del ion más intenso (pico base). Los espectros de masas de cada patrón y de su correspondiente pico en la muestra aparecen en las figuras 6, 7, 8, 9 y 10.

Tabla 1-Iones característicos de los trimetilsilil éteres de los oxisteroles.

Oxisteroles (Trimetilsilil éteres)	Iones característicos de los derivados silanizados de los oxisteroles*										Caract. de esteroles con doble enlace en 5 ^b				
	M ^a	M-15	M-90	M-105	M-180	M-195	Otros iones característicos								
α-CE	474	459	384	369			456 ^d	366	120 ^e	105 ^e		129			
	(8) ^c	(3)	(11)	(5)			(1)	(10)	(B) ^f	(95)		(85)			
7β-HC	546		456	441	366	351						129			
	(1)		(B)	(3)	(3)	(3)						(43)			
CT							546	531	456	441	403	367	351	321	129
							(8)	(4)	(26)	(7)	(37)	(7)	(3)	(26)	(B)
7-CC	472	457	382	367			187 ^e	174 ^e	161 ^e					129	
	(18)	(3)	(6)	(16)			(17)	(17)	(39)					(B)	
25-HC	546 ^a	531 ^a	456	441 ^a	366 ^a	351 ^a	327	271	131					129	
			(1)				(1)	(3)	(B)					(21)	

* NOTA: La mayoría de los iones que figuran en esta tabla han sido descritos por los diferentes autores que han trabajado con estos compuestos; no obstante, algunos de ellos sólo han sido descritos por muy pocos de estos autores. En este último caso, en la tabla figuran también los autores que los han descrito.

^a Ion molecular.

^b Este ion según Dumazer *et al.* (1986) es característico y muy intenso en todos los esteroides con un doble enlace en la posición 5.

^c Porcentaje respecto al pico base.

^d Park y Addis (1992).

^e Ningún autor les ha dado relevancia hasta el momento aunque aparecen en el espectro de masas presentado por Park y Addis (1986a) para este compuesto.

^f Pico base.

^g Zhang *et al.* (1991).

^h Picos poco intensos que, al no llegar al 1% del pico base, desaparecen al normalizar (figura 10, página 253)(son picos poco importantes en nuestro caso).

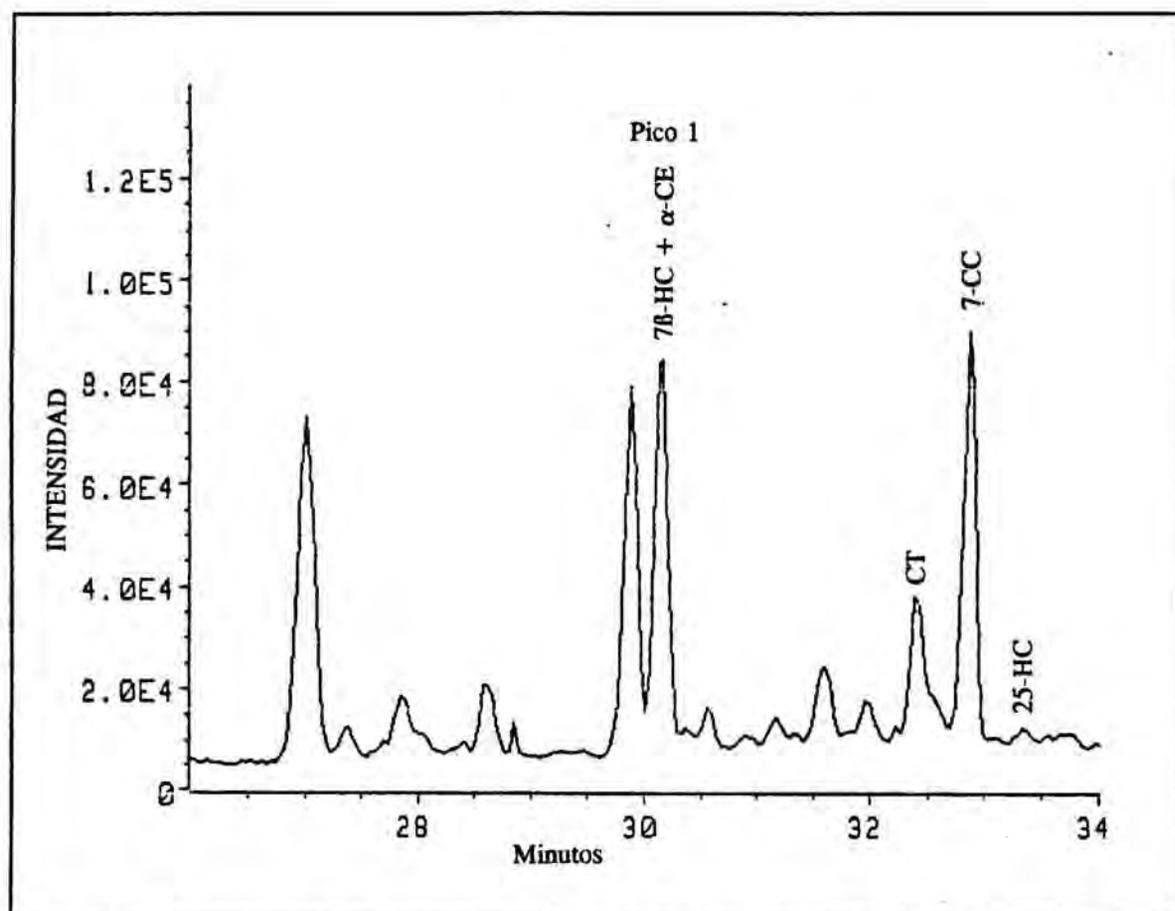


Figura 5-Zona final del cromatograma de un extracto silanizado obtenido con el método 3 a partir de la muestra de huevo en polvo.

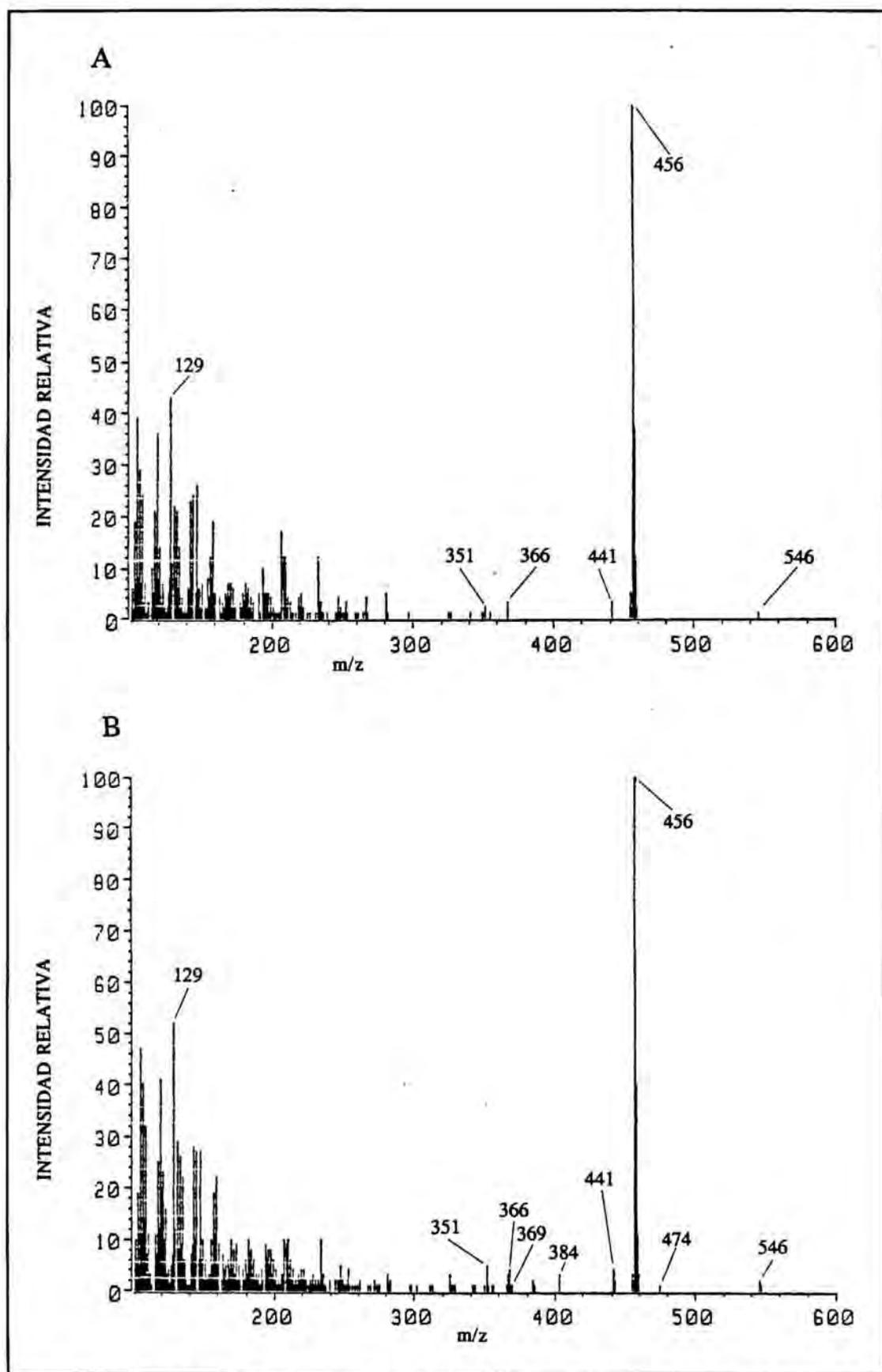


Figura 6-EM del patrón silanizado del 7β -HC (A) y de la zona inicial del pico 1 (B).

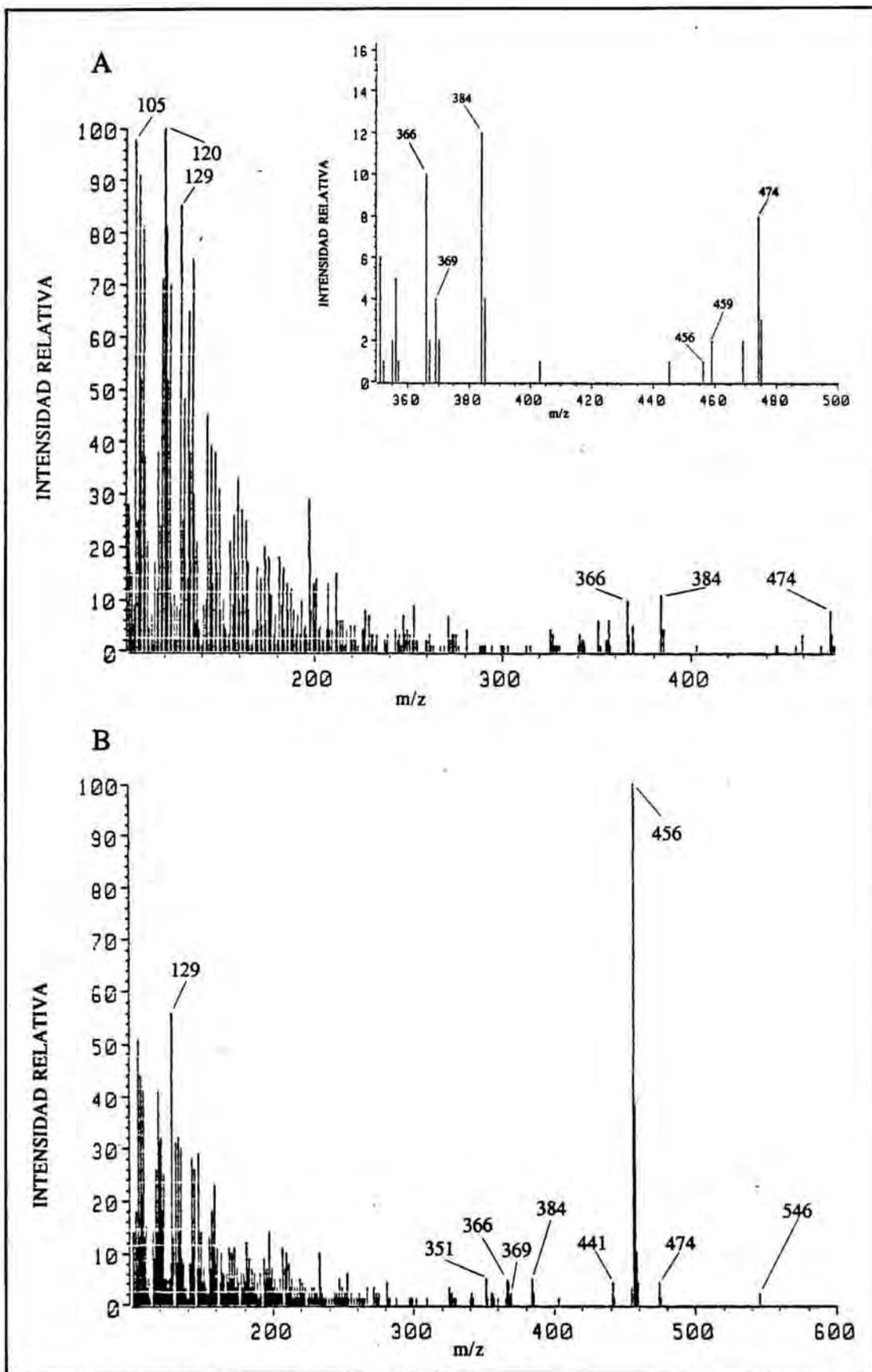


Figura 7-EM del patrón silanizado de α -CE (A) y de la zona final del pico 1 (B).

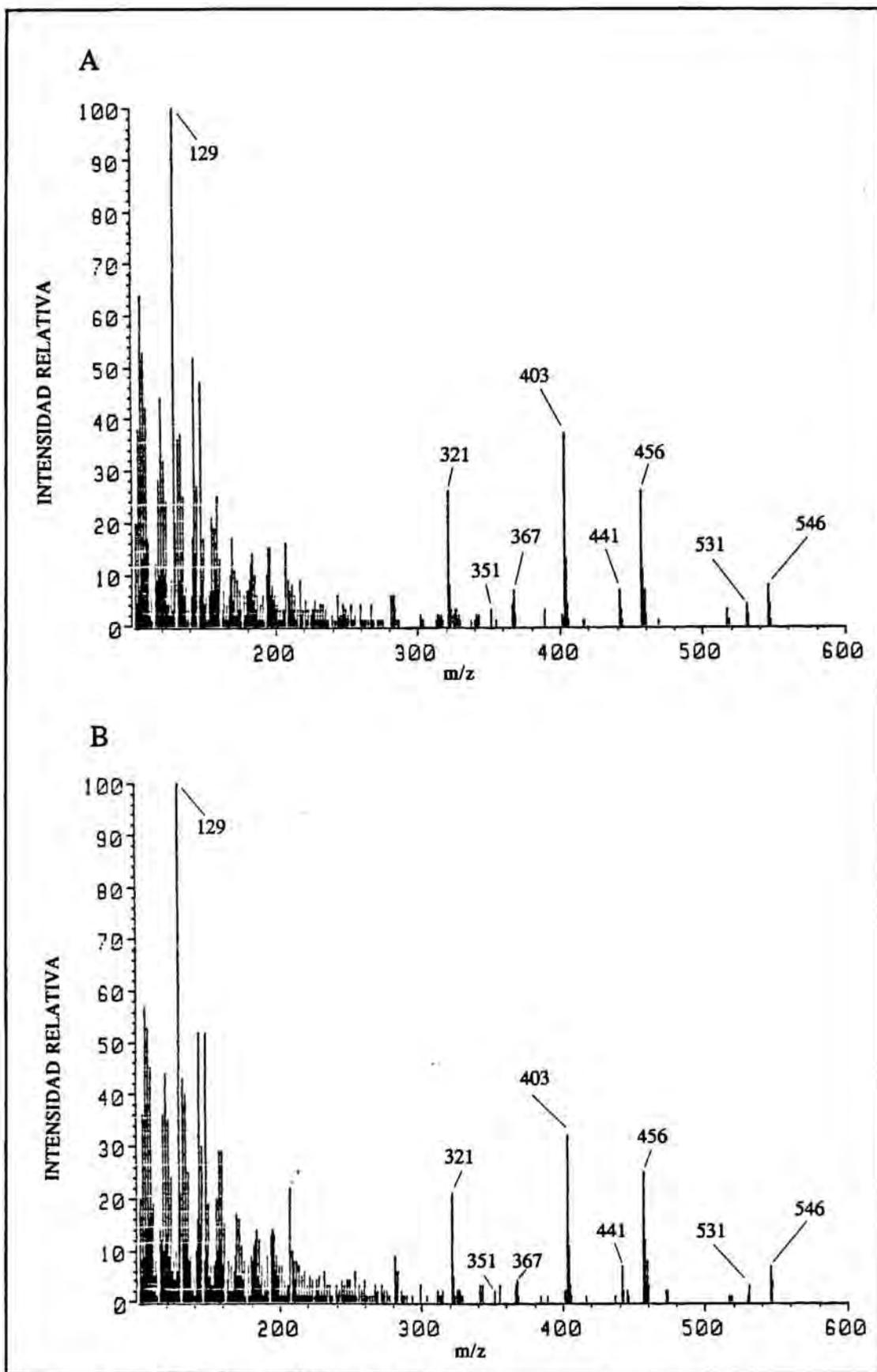


Figura 8-EM del patrón silanizado de CT (A) y de su correspondiente pico en la muestra (B).

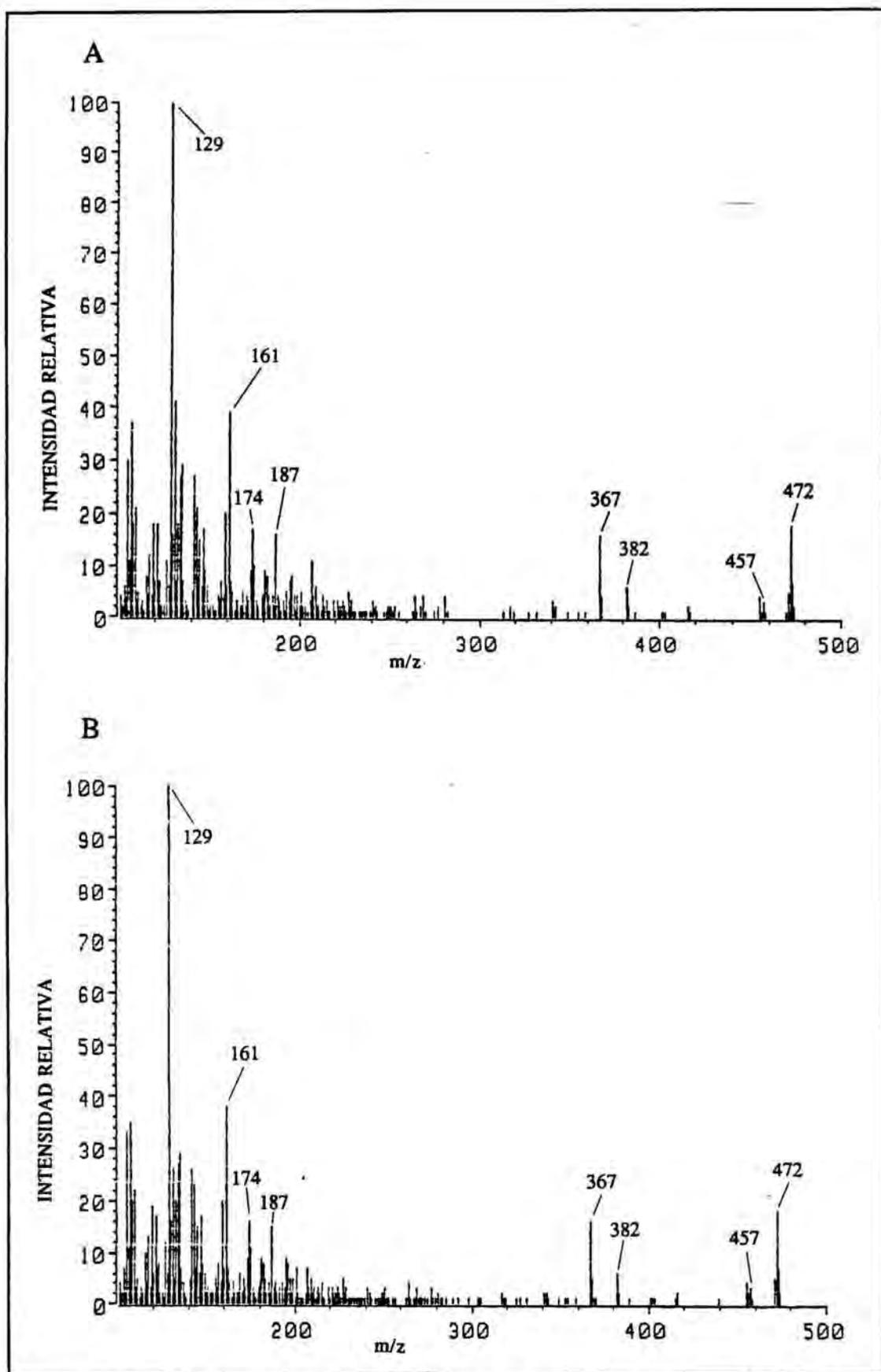


Figura 9-EM del patrón silanizado de 7-CC (A) y de su correspondiente pico en la muestra (B).

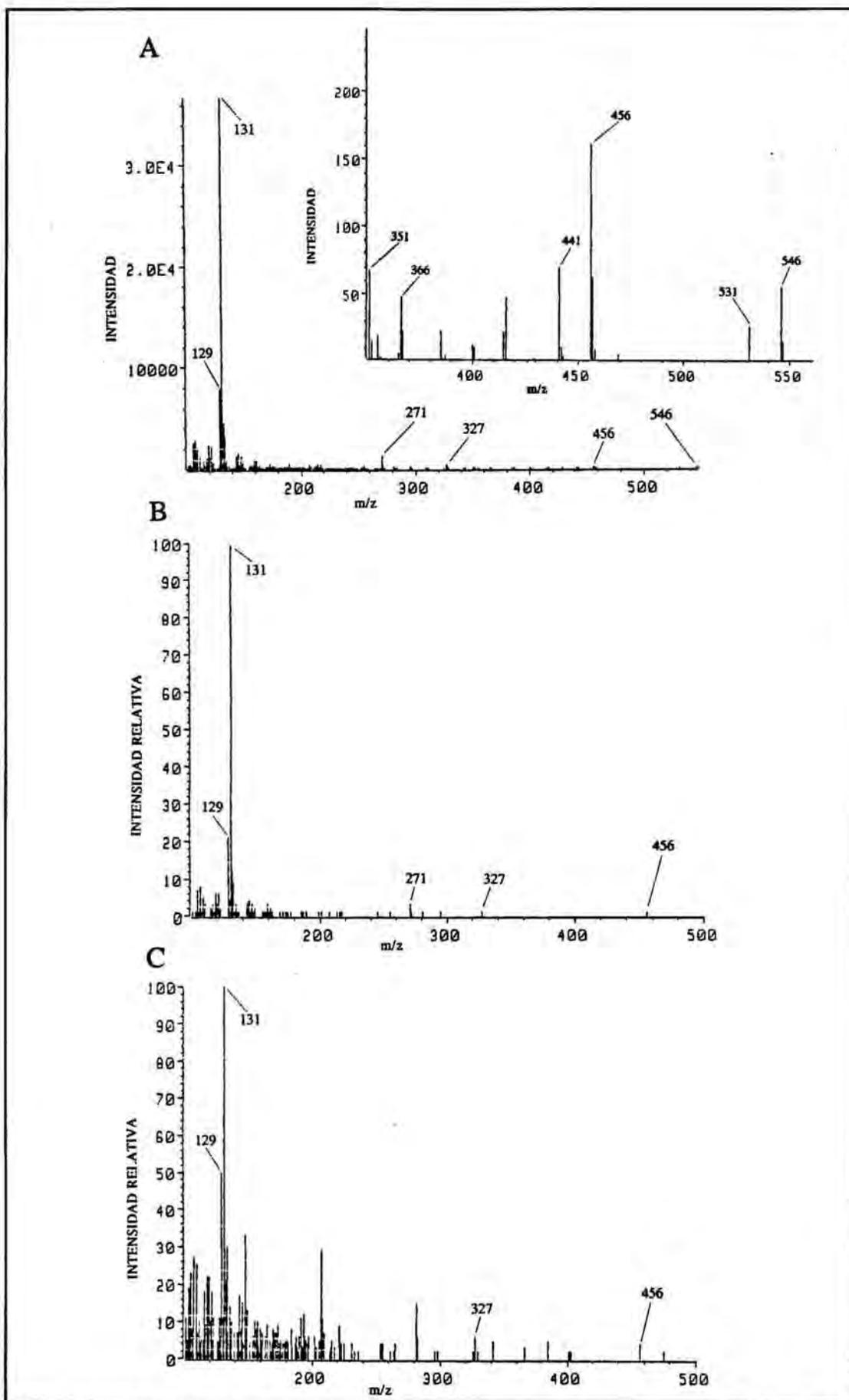


Figura 10-EM del patrón silanizado de 25-HC (A, sin normalizar; B, normalizado) y de su correspondiente pico en la muestra (C).

Si observamos los EM correspondientes a la zona inicial del pico 1 (figura 6) y a su zona final (figura 7), vemos que en ambos espectros aparecen los iones característicos del 7 β -HC y del α -CE, pero en el de la zona final son más intensos los iones característicos del α -CE (474, M; 384, M-90; y 369, M-105) prueba inequívoca de que este pico está constituido por estos dos compuestos, siendo su zona inicial más rica en 7 β -HC y la final en α -CE. Por lo que hace referencia a los picos presuntamente correspondientes a los 3 OE restantes, vemos (figuras 8, 9 y 10) que queda claramente confirmada su identificación por espectrometría de masas.

3. MEJORA, CARACTERIZACIÓN Y COMPARACIÓN DE TRES MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE OXIESTEROLES.

3.1. PRUEBAS PREVIAS.

3.1.1. COMPROBACIÓN DE QUE NO SE PRODUCE OXIDACIÓN DEL COLESTEROL DURANTE LA APLICACIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS.

Para realizar esta comprobación en primer lugar nos cercioramos de la pureza del patrón de colesterol que íbamos a utilizar, para ello se disolvieron 0.8, 1.8 y 3.5 mg de colesterol en 50 μ l de piridina. A cada una de estas tres soluciones se añadieron 50 μ l de reactivo silanizante y se esperaron 20 min hasta la silanización del colesterol, las mezclas silanizadas se inyectaron en el cromatógrafo de gases, comprobándose la pureza del patrón a partir del cromatograma obtenido.

Una vez hecho esto se cogieron 15 mg de colesterol, que son los mg de este compuesto que aproximadamente presentan 0.95 g de huevo en polvo o 3.8 g de huevo fresco (Scherz y Senser, 1989), y se depositaron en un matraz Erlenmeyer de 25 ml. Sobre este colesterol se aplicaron las diferentes etapas del método 3, hasta la silanización y posterior inyección. Esta

prueba se realizó por cuadruplicado. En los cromatogramas obtenidos aparecieron picos muy pequeños (nivel trazas) que no fueron identificados como OE, con lo que se pudo concluir que el método 3 no daba lugar a artefactos procedentes de la oxidación del colesterol. Esta conclusión se hizo extensiva a los otros dos métodos, ya que el método 3 constituye una fusión de los otros dos.

La obtención de estos resultados esta condicionada al hecho de trabajar de la manera que se describe en el apartado 2.5. (páginas 234-242), prestando especial atención a operar: bajo condiciones atenuadas de luz, evaporando las diferentes soluciones a baja temperatura hasta aproximadamente 1 ml, nunca hasta sequedad, y eliminando las últimas fracciones de disolvente con corriente de nitrógeno y mediante la aplicación de vacío en un desecador. La no observación de estas condiciones de trabajo implica la formación de derivados oxidados del colesterol, pues, se observó la formación de pequeñas cantidades de 7 β -HC y 7-CC cuando se evaporó hasta sequedad a una temperatura de 45 °C.

La identificación se realizó por espectrometría de masas bajo las condiciones anteriormente descritas en el apartado 2.6.1. (página 243). Para esta identificación, y con el fin de aumentar la sensibilidad, se trabajó, además de con el rango de masas (m/z) entre 100-650, con la técnica SIM (Selected Ion Monitoring), consistente en seleccionar solamente para que sean leídos los iones más característicos e intensos de los 5 OE que se determinan. Estos iones fueron (m/z): 120, 129, 131, 321, 367, 382, 384, 403, 456, 472, 474 y 546.

3.1.2. ENSAYO DE ELIMINACIÓN DE LAS IMPUREZAS CON ELEVADO TIEMPO DE RETENCIÓN.

Los extractos finales obtenidos con los tres métodos, al ser inyectados tras su silanización, presentaron impurezas con elevado TR que hicieron necesario un tiempo de purga a 290 °C. Estas impurezas eran mucho más numerosas y cuantiosas cuando se trabajaba con el método 2 que con los métodos 1 y 3, siendo, a la vez, ligeramente superiores en cantidad para el método 1 respecto al 3, es decir, los métodos 1 y 3 presentaban el mismo número de impurezas y a idénticos tiempos de retención; aunque a concentraciones ligeramente

superiores para el método 1. Con el método 2, junto con las mismas impurezas que aparecen en los métodos anteriores, se detectan otras adicionales y además todas ellas a niveles muy superiores.

A la vista de los resultados, se pensó que el origen de estas impurezas, en los métodos 1 y 3, se encontraba muy posiblemente estructuras glicéricas que no habían sido completamente saponificadas. Para intentar eliminar este problema, se modificó el método 3 según un diseño factorial 2 x 2 (saponificación con 2 normalidades de potasa metanólica, 1N o 2N; y elución del cartucho de gel de sílice utilizando como última fracción de la secuencia de elución 10 ml de acetona/metanol, 60:20, v/v o 10 ml de acetona). La modificación en la normalidad de la potasa se introdujo para saber si el origen de las impurezas se encontraba en una saponificación incompleta, mientras que la modificación en la elución se realizó con la finalidad de elucidar si las impurezas eran TG o bien FL no saponificados completamente. Se realizaron dos réplicas de este diseño, resultando que las impurezas fueron ligeramente superiores cuando se trabajaba con potasa 1N y con acetona, pero en ninguno de los casos las diferencias fueron estadísticamente significativas.

Según estos resultados, no se pudo concluir que ninguna de las dos modificaciones introducidas en el método 3 fuera válida para reducir los niveles de impurezas. Según los datos bibliográficos de los que se dispone, estas impurezas difícilmente podían ser TG, ya que estos compuestos eluyen con las fracciones más apolares de la elución. Por otro lado, tampoco podían ser FL, pues, diversos autores que han trabajado con eluciones similares a la utilizada por nosotros han descrito que los FL quedan retenidos en la columna de gel de sílice (De Vore, 1988; Fontana *et al.*, 1992; Nawar *et al.*, 1991; Tsai *et al.*, 1980; Tsai y Hudson, 1985; Tsai *et al.*, 1980; Van de Bovenkamp *et al.*, 1988; Zubillaga y Maerker, 1991). Ante esto, se podría pensar que el origen de estas impurezas en los métodos 1 y 3 se halla en compuestos de polaridad intermedia como los monoglicéridos procedentes de los TG saponificados incompletamente (Nourooz-Zadeh y Appelqvist, 1987). Sin embargo, esto no está en consonancia con el hecho de que las impurezas que se presentan en los métodos 1 y 3 también lo hagan en el método 2, que no presenta saponificación. Esta dificultades nos obligaron a obviar este problema practicando una purga a 290 °C. Van de Bovenkamp *et al.*, (1988) describió una purga similar para la determinación de OE por cromatografía de gases.

3.1.3. INFLUENCIA DEL MATERIAL CONSTITUYENTE DEL MICROTUBO DE SILANIZACIÓN.

En el transcurso de la realización de una curva de calibrado para el colesterol y los OE, utilizando como PI el 5α -colestano, se observó que la naturaleza del material que constituía los microtubos, donde se depositaban los patrones para ser silanizados, influía en los resultados obtenidos. Concretamente, se observó que, para una misma concentración, existía una diferencia notable entre los resultados obtenidos con microtubos de polipropileno (PP) homopolímero de una casa comercial y los obtenidos con microtubos de PP copolímero de otra marca comercial. Esta diferencia era debida a la diferente adsorción de los patrones en función de la naturaleza del material que constituía el microtubo de silanización.

3.1.3.1. ESTUDIO DE LA ADSORCIÓN DE LOS OXIESTEROLES EN LOS MICROTUBOS DE SILANIZACIÓN DE DIFERENTES MATERIALES.

Con motivo de la observación anterior y con el objeto de comprobar la influencia de la adsorción de los diferentes patrones utilizados en la determinación de OE en los materiales constituyentes de los microtubos de silanización, se planteó el siguiente estudio. Se trabajó con microtubos de PP homopolímero, PP copolímero y de vidrio Pyrex. Se tomaron 6 microtubos de cada tipo, se añadieron a cada uno de ellos $5\ \mu\text{g}$ de cada OE y $5\ \mu\text{g}$ de colesterol, se disolvieron los OE y el colesterol en $50\ \mu\text{l}$ de piridina, se añadieron $50\ \mu\text{l}$ de reactivo silanizante y se esperaron 20 minutos. Tras este tiempo, $50\ \mu\text{l}$ de la mezcla silanizada se pasaron a un microtubo de vidrio Pyrex con $37.5\ \mu\text{g}$ de 5α -colestano (PI). Tras 20 minutos de espera, $2\ \mu\text{l}$ de esta última mezcla se inyectaron por duplicado en el cromatógrafo de gases. Por otro lado, para ver como se adsorbía el 5α -colestano en los diferentes microtubos de silanización, se cogieron 6 tubos más de cada tipo, se añadieron a cada uno de ellos $75\ \mu\text{g}$ de 5α -colestano, se disolvió el 5α -colestano en $50\ \mu\text{l}$ de piridina, se añadieron $50\ \mu\text{l}$ de reactivo silanizante y se esperaron 20 minutos. Tras este tiempo, $50\ \mu\text{l}$ de esta mezcla se pasaron a un microtubo de vidrio con $37.5\ \mu\text{g}$ de colesterol, que aquí actuaba como PI. Tras 20 minutos de espera, $2\ \mu\text{l}$ de esta última mezcla se inyectaron por

duplicado en el cromatógrafo de gases. Con los cromatogramas obtenidos tras la inyección, se calculó para cada patrón la relación área patrón/área PI (A_{px}/A_{pi}). Esta relación resultó ser, para todos los patrones, mayor en los microtubos de vidrio. Las diferencias existentes entre los resultados obtenidos, expresadas como porcentaje de adsorción, respecto al vidrio, figuran en la tabla 2. En este estudio el patrón utilizado como PI siempre se depositó en los microtubos de vidrio Pyrex, para evitar la variabilidad debida a su adsorción.

Tabla 2- Porcentajes medios de adsorción del 5 α -colestano, colesterol y de los 5 OE en microtubos de PP homopolímero y copolímero, relativos al vidrio, (se consideró que los patrones no se adsorbían en el vidrio).

Material	5 α -colestano	Colesterol	α -CE ^a	7 β -HC	CT	7-CC	25-HC
PP homopolímero	9.20	8.35	11.31	16.02	3.77	11.16	3.70
PP copolímero	19.40	11.62	7.76	10.60	0.11	8.80	1.39

^a Símbolos: α -CE (5,6 α -epoxi-5 α -colestano-3 β -ol), 7 β -HC (colest-5-en-3 β ,7 β -diol), CT (5 α -colestano-3 β ,5,6 β -triol), 7-CC (3 β -hidroxicolest-5-en-7-ona) y 25-HC (colest-5-en-3 β ,25-diol).

Para saber si existían diferencias estadísticamente significativas entre las relaciones medias A_{px}/A_{pi} de cada patrón en función del material del microtubo, se aplicó, para cada uno de estos patrones, el análisis de la variancia para grupos independientes. El análisis de la variancia señaló la existencia de diferencias estadísticamente significativas para el 5 α -colestano ($P < 0.0001$), colesterol ($P = 0.0035$) y α -CE ($P < 0.0001$). Para estos 3 patrones se aplicó la prueba de Scheffé para contrastes a "posteriori" ($\alpha = 0.05$) y los resultados de la aplicación de esta prueba figuran en la tabla 3. Los intervalos de confianza de los contrastes significativos se expresaron en porcentaje de adsorción (relativo al vidrio).

Tabla 3-Resultados de los contrastes a "posteriori" para las relaciones medias A_{px}/A_{pi} del 5 α -colestano, colesterol y α -CE en función del material constituyente de los microtubos (prueba de Scheffé, $\alpha = 0.05$).

Compuesto	Material	PP homopolímero	PP copolímero
5 α -colestano	Vidrio Pyrex	P < 0.0001 (4.48 ÷ 13.92) ^a	P < 0.0001 (14.68 ÷ 24.12)
	PP homoplímero		P < 0.0001 (5.48 ÷ 14.92)
Colesterol	Vidrio Pyrex	NS ^b	P = 0.0035 (3.15 ÷ 20.08)
	PP homopolímero		NS
α -CE ^c	Vidrio Pyrex	P < 0.0001 (6.49 ÷ 25.73)	P = 0.0311 (1.07 ÷ 20.12)
	PP homopolímero		NS

^a P = grado de significación del contraste, entre paréntesis figura el intervalo de confianza de este contraste expresado en porcentaje de adsorción (relativo al vidrio).

^b La diferencia entre las relaciones medias A_{px}/A_{pi} de este compuesto para estos dos tipos de microtubo no es estadísticamente significativa (NS = no significativa).

^c α -CE = 5,6 α -epoxi-5 α -colestano-3 β -ol.

En la tabla 3, podemos ver que el 5 α -colestano, que en aquel momento era utilizado como PI para la determinación de OE, en el PP homopolímero se adsorbió, en media, entre un 4.48 y un 13.92 % más que en el vidrio. Por otro lado, este compuesto se adsorbió en el PP copolímero entre un 14.68 y un 24.12 % más que en el vidrio; y entre un 5.48 y un 14.92 % más que en el PP homopolímero. El colesterol en el PP copolímero se adsorbió, en media, entre un 3.15 y un 20.08% más que en el vidrio. El α -CE se adsorbió en el PP homopolímero, en media, entre un 6.49 y un 25.73% más que en el vidrio. Este mismo compuesto se adsorbió en el PP copolímero, en media, entre un 1.07 y un 20.12% más que en el vidrio.

3.1.3.2. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL MATERIAL CONSTITUYENTE DEL MICROTUBO DE SILANIZACIÓN SOBRE LOS VALORES DE A_{px}/A_{pi} .

El hecho de que el 5 α -colestano fuera uno de los compuestos que más se adsorbiera junto con su condición de patrón interno en aquel momento, nos llevó a plantear el estudio que se describe a continuación. En este estudio el 5 α -colestano (PI) se añadió junto con los demás patrones a los tres tipos de microtubos de silanización. Esto se hizo así ya que para la

obtención de rectas de calibrado y de factores de respuesta relativos (FRR), el 5α -colestano siempre se añadió al microtubo de silanización junto al resto de patrones, se silanizó el contenido del microtubo y se inyectaron por duplicado $2 \mu\text{l}$ de la mezcla silanizada. De este modo, para este estudio se cogieron 4 microtubos de cada uno de los 3 materiales, a cada uno de ellos se le añadieron $75 \mu\text{g}$ de 5α -colestano (PI), $5 \mu\text{g}$ de cada uno de los OE y $5 \mu\text{g}$ de colesterol, se silanizó el contenido de los microtubos y se inyectaron por duplicado $2 \mu\text{l}$ de esta mezcla silanizada en el cromatógrafo de gases. De esta manera se obtuvieron cromatogramas a partir de los cuales se calculó la relación A_{px}/A_{pi} para cada patrón y cada tipo de microtubo. En este caso, a diferencia de en el estudio anterior, esta relación venía afectada por la adsorción del patrón y del PI en el material que constituía el microtubo. Las medias obtenidas para la relación A_{px}/A_{pi} , para cada uno de los patrones en cada uno de los materiales, figuran en la tabla 4.

Tabla 4-Medias de la relación A_{px}/A_{pi} para cada patrón en cada tipo de microtubo ($n = 4$).

Material	Colesterol	α -CE ^a	7 β -HC	CT	7-CC	25-HC
Vidrio Pyrex	0.0862	0.0582	0.0751	0.0710	0.0556	0.0489
PP homopolímero	0.0918	0.0622	0.0801	0.0755	0.0601	0.0567
PP copolímero	0.1129	0.0843	0.1084	0.1082	0.0795	0.0783

^a Símbolos: α -CE ($5,6\alpha$ -epoxi- 5α -colestano- 3β -ol), 7 β -HC (colest-5-en- 3β ,7 β -diol), CT (5α -colestano- 3β ,5,6 β -triol), 7-CC (3β -hidroxicolest-5-en-7-ona) y 25-HC (colest-5-en- 3β ,25-diol).

De los resultados que figuran en la tabla 4 se desprende que la media de la relación A_{px}/A_{pi} es máxima para todos los patrones en el PP copolímero y mínima en el vidrio Pyrex. Esto es debido a que en el PP copolímero el 5α -colestano se adsorbe más que en el PP homopolímero y mucho más que en el vidrio. No obstante, para ver si las diferencias existentes entre las relaciones medias A_{px}/A_{pi} de cada patrón en función del material eran estadísticamente significativas, se aplicó, para cada uno de estos compuestos, el análisis de la variancia para grupos independientes. El análisis de la variancia señaló la existencia de diferencias estadísticamente significativas para el colesterol ($P=0.0003$), 7 β -HC ($P < 0.0001$), α -CE ($P < 0.0001$), CT ($P=0.0001$), 7-CC ($P=0.0003$) y 25-HC ($P < 0.0001$). A

continuación, para estos 6 patrones se aplicó la prueba de Scheffé para contrastes a "posteriori" ($\alpha = 0.05$) y los resultados de esta prueba figuran en la tabla 5.

Tabla 5-Resultados de los contrastes a "posteriori" para las medias de la relación A_{px}/A_{pi} de cada uno de los 6 patrones en función del material constituyente de los microtubos (prueba de Scheffé, $\alpha = 0.05$).

Compuesto	Material	PP homopolímero	PP copolímero
Colesterol	Vidrio Pyrex	NS ^a	$P=0.0005(0.014 \div 0.039)^b$
	PP homopolímero		$P=0.0024(0.009 \div 0.033)$
α -CE ^c	Vidrio Pyrex	NS	$P < 0.0001(0.019 \div 0.034)$
	PP homopolímero		$P < 0.0001(0.015 \div 0.030)$
7 β -HC	Vidrio Pyrex	$P=0.0130(0.001 \div 0.010)$	$P < 0.0001(0.029 \div 0.037)$
	PP homopolímero		$P < 0.0001(0.024 \div 0.032)$
CT	Vidrio Pyrex	NS	$P=0.0003(0.022 \div 0.053)$
	PP homopolímero		$P=0.0007(0.017 \div 0.048)$
7-CC	Vidrio Pyrex	NS	$P=0.0004(0.013 \div 0.035)$
	PP homopolímero		$P=0.0017(0.009 \div 0.030)$
25-HC	Vidrio Pyrex	$P=0.0254(0.001 \div 0.015)$	$P < 0.0001(0.023 \div 0.036)$
	PP homopolímero		$P < 0.0001(0.015 \div 0.028)$

^a La diferencia entre las relaciones medias A_{px}/A_{pi} de este compuesto para estos dos tipos de microtubo no es estadísticamente significativa (NS = no significativa).

^b P = grado de significación del contraste, entre paréntesis figura el intervalo de confianza de este contraste.

^c Símbolos: α -CE (5,6 α -epoxi-5 α -colestán-3 β -ol), 7 β -HC (colest-5-en-3 β ,7 β -diol), CT (5 α -colestán-3 β ,5,6 β -triol), 7-CC (3 β -hidroxicolest-5-en-7-ona) y 25-HC (colest-5-en-3 β ,25-dioli).

En la tabla 5 podemos ver que, para todos los patrones, la media de la relación A_{px}/A_{pi} es significativamente mayor en el PP copolímero que en el vidrio y que en el PP homopolímero. Asimismo, para el 7 β -HC y el 25-HC, la media de la relación A_{px}/A_{pi} es significativamente mayor en el PP homopolímero que en el vidrio Pyrex.

3.1.3.3. CONCLUSIONES RELACIONADAS CON EL USO DE MICROTUBOS DE SILANIZACIÓN DE DIFERENTES MATERIALES.

Según todos estos resultados, pudimos concluir que el material que constituye los microtubos de silanización influye en los resultados obtenidos. El caso en el que esta influencia tendría mayores repercusiones sería el del cálculo de los factores de respuesta relativos (FRR) de los diferentes patrones, que variarían en función del material del microtubo utilizado. Esto es debido a que estos factores se calculan relativos a la respuesta del PI, que sería aparentemente menor al trabajar con los materiales plásticos, debido a la mayor adsorción del mismo en estos materiales.

Por todas estas razones, se optó por utilizar únicamente los microtubos de vidrio Pyrex en la silanización previa a la determinación cromatográfica.

3.1.4. RECUPERACIÓN DEL COLESTEROL Y OXIESTEROLES A TRAVÉS DEL CARTUCHO DE GEL DE SÍLICE: UTILIZACIÓN DE DIFERENTES DISOLVENTES PARA SU ELUCIÓN.

Con el fin de determinar cual era la secuencia de disolventes más adecuada para eluir los diferentes OE, que queríamos determinar en nuestras muestras, a través del cartucho de gel de sílice (Sep-Pak cartridge), se planteó el estudio que se describe a continuación.

Se ensayaron 4 eluciones distintas con diferentes secuencias de disolventes. Se utilizaron patrones del colesterol y de los 5 OE que queríamos determinar (α -CE, 7 β -HC, CT, 7-CC y 25-HC). Se ensayaron, para cada una de las eluciones, los 3 niveles de concentración que figuran en la tabla 6. En esta tabla se observa que para el colesterol, realmente, se ensayó una única concentración. Estas concentraciones ensayadas, para los OE, fueron elegidas en función de los datos que se tenían, hasta aquel momento, del contenido de estos compuestos en huevo en polvo obtenido por atomización. El esquema de las eluciones ensayadas se representa en la figura 11.

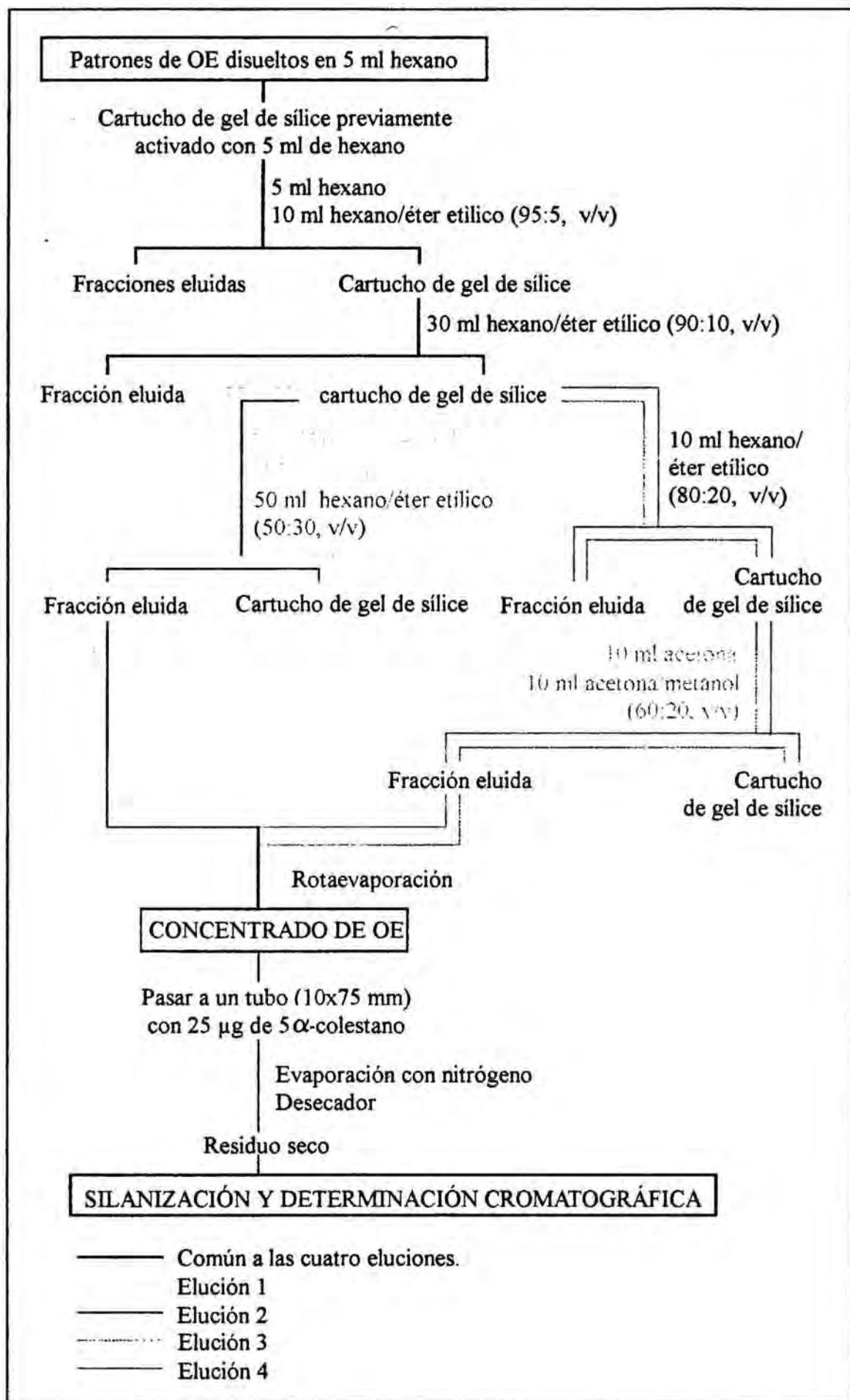


Figura 11-Esquema de las cuatro eluciones ensayadas.

Tabla 6-Pesos en μg de colesterol y oxisteroles correspondientes a cada uno de los 3 niveles de concentración.

Nivel de concentración	Colesterol	α -CE ^a	7 β -HC	CT	7-CC	25-HC
Nivel 1	30	2.5	5	2.5	2.5	2.5
Nivel 2	30	5	10	5	5	5
Nivel 3	30	10	20	10	10	10

^a Símbolos: α -CE (5,6 α -epoxi-5 α -colestano-3 β -ol), 7 β -HC (colest-5-en-3 β ,7 β -diol), CT (5 α -colestano-3 β ,5,6 β -triol), 7-CC (3 β -hidroxicolest-5-en-7-ona), 25-HC (colest-5-en-3 β ,25-diol)

La elución número 1 presentaba la siguiente secuencia: el cartucho de gel de sílice se activó mediante 5 ml de hexano; los patrones del colesterol y de los 5 OE, en un vaso de precipitados de 50 ml, se disolvieron en 5 ml de hexano y se aplicaron al cartucho; la elución de los patrones se inició con 5 ml de hexano y, a continuación, con 10 ml de hexano/éter etílico (95:5, v/v). Estos 2 eluyentes se utilizaron para lavar el vaso de precipitados y conseguir el paso cuantitativo de los patrones al cartucho; y, finalmente, la elución continuó con 30 ml de hexano/éter etílico (90:10, v/v) y 20 ml de hexano/éter etílico (50:30, v/v). Los 20 ml de esta última fracción se recogieron en un matraz de fondo redondo y se concentraron hasta aproximadamente 1 ml por medio de un evaporador rotatorio de vacío. Este concentrado se transfirió cuantitativamente con la ayuda de pequeñas fracciones de éter etílico a un tubo de vidrio Pyrex (10 x 75 mm) con 25 μg de 5 α -colestano (PI). El disolvente se dejó evaporar, en gran parte, bajo campana, pero las últimas fracciones de éste se eliminaron mediante leve corriente de nitrógeno y, a continuación, en un desecador con la aplicación de vacío creciente. Después de 1 hora en el desecador con un vacío de 750 mm Hg se procedió, de la manera ya descrita anteriormente, a la silanización y, después, a la inyección en el cromatógrafo de gases. De esta manera, se determinó la presencia de patrones en la fracción recogida y se pudo calcular la recuperación de los diferentes patrones a través del cartucho con esta secuencia de elución. Esta secuencia es similar a la utilizada en diversos trabajos en los que se determinó el contenido de epoxicolesteroles en ovoproductos (Tsai y Hudson, 1987; Tsai *et al.*, 1980).

La elución número 2 presentó una secuencia idéntica a la número 1, sólo difirió de ella en que los 20 ml de hexano/éter etílico (50:30, v/v) pasaron a ser 50 ml de la misma mezcla. Estos 50 ml se recogieron en un matraz de fondo redondo y se trataron de la misma manera que los 20 ml recogidos en la elución anterior. Esta secuencia de elución es idéntica a la empleada por Morgan y Arsmtrong (1987) en la determinación del contenido de epoxicolesteroles en yema de huevo en polvo obtenida por atomización.

La elución número 3 presentó una secuencia inicial idéntica a la de las dos eluciones anteriores, sólo difirió de ellas a partir de la aplicación al cartucho de 30 ml de hexano/éter etílico (90:10, v/v). En este punto, la elución número 3 continuó con la aplicación al cartucho de 10 ml de hexano/éter etílico (80:20, v/v) y de 10 ml de acetona. Los 10 ml de esta última fracción se recogieron en un matraz de fondo redondo y se trataron de la misma manera que las fracciones recogidas en las eluciones anteriores. Esta secuencia de elución es muy parecida a la utilizada por Morgan y Armstrong (1989, 1992) para determinar el contenido de OE (α -CE, β -CE, 7α -HC, 7β -HC y 7-CC) en yema de huevo en polvo obtenida por atomización.

La elución número 4 presentó una secuencia idéntica a la número 3, sólo difirió de ella en que los 10 ml de eluyente final (acetona) pasaron a ser 10 ml de acetona/metanol (60:20, v/v). Estos 10 ml se recogieron en un matraz de fondo redondo y se trataron de la misma manera que los 10 ml de acetona recogidos en la elución anterior. Con este cambio, introducido por nosotros, se aumenta la polaridad de la elución 4 respecto a la 3. De este modo, estas eluciones presentan, de la 1 a la 4, polaridad creciente.

En las 4 eluciones, el paso de los diferentes eluyentes a través del cartucho de gel de sílice se realizó, a una velocidad de aproximadamente 7 ml/min, mediante la aplicación de presión con una jeringa.

Se realizaron 15 repeticiones de cada una de las 4 eluciones, resultando un total de 60 repeticiones. De las repeticiones realizadas para cada elución, 5 de ellas correspondieron al nivel de concentración 1, otras 5 al nivel 2 y las 5 restantes al nivel 3. Las recuperaciones

del colesterol, α -CE, 7 β -HC, CT, 7-CC y 25-HC, para cada elución y nivel de concentración, figuran, respectivamente, en las tablas 7, 8, 9, 10, 11 y 12.

Tabla 7- Porcentajes de recuperación del colesterol para las diferentes eluciones ensayadas.*

Elución 1	Elución 2	Elución 3	Elución 4
8.12	12.39	2.94	2.07
4.28	5.22	2.83	2.32
5.09	6.49	3.00	3.23
10.68	14.98	4.02	3.85
7.50	8.35	4.35	2.61
4.68	5.68	2.53	3.10
4.99	6.17	4.76	2.72
12.04	3.78	4.25	4.12
5.05	15.98	2.33	2.09
10.81	15.18	2.46	2.66
5.28	5.83	3.37	4.37
12.28	7.08	4.80	3.53
5.72	6.05	4.01	2.45
5.09	13.93	2.45	2.71
10.04	16.00	2.53	2.38
$\bar{X}_G^a =$ 7.44	9.54	3.38	2.95
CV(%) ^b = 39.62	47.92	26.65	24.75

* NOTA: para el colesterol sólo se ensayó una concentración.

^a Media global (n = 15).

^b Coeficiente de variación en tanto por ciento.

Tabla 8- Porcentajes de recuperación del α -CE para las diferentes eluciones y niveles de concentración ensayados.

NC ^a	Elución 1	Elución 2	Elución 3	Elución 4
1	32.67	65.21	97.42	98.00
1	27.63	55.15	90.96	97.30
1	39.94	75.74	100.06	101.05
1	37.50	74.87	98.92	97.33
1	28.29	56.48	100.75	100.82
$\bar{X}_1 =$	33.20	65.49	97.62	98.90
CV(%) ^b =	16.46	14.91	4.03	1.90
2	35.53	66.93	100.82	100.31
2	30.18	60.26	101.77	98.29
2	29.02	57.94	94.61	98.96
2	39.05	73.97	100.56	98.92
2	35.36	70.60	94.08	97.78
$\bar{X}_2 =$	33.83	65.94	98.36	98.85
CV(%) =	12.27	10.27	3.77	0.96
3	31.05	72.50	101.39	98.06
3	35.79	67.00	100.28	100.36
3	33.08	72.96	100.07	98.19
3	37.87	57.14	94.64	98.83
3	35.28	57.66	94.69	98.69
$\bar{X}_3 =$	34.61	65.39	98.22	98.83
CV(%) =	7.57	11.69	3.34	0.93
$\bar{X}_G^c =$	33.88	65.61	98.07	98.86
CV(%) =	11.72	11.52	3.46	1.24

^a NC = nivel de concentración.

^b Coeficiente de variación en tanto por ciento.

^c Media global (n = 15).

Tabla 9-Porcentajes de recuperación del 7β -HC para las diferentes eluciones y niveles de concentración ensayados.

NC ^a	Elución 1	Elución 2	Elución 3	Elución 4
1	2.73	4.83	93.60	99.15
1	7.99	5.08	96.67	95.63
1	1.24	5.05	98.42	97.90
1	1.01	0.93	94.31	100.44
1	0.30	16.14	100.25	99.60
$\bar{X}_1 =$	2.65	6.40	96.65	98.55
CV(%) ^b =	117.34	89.24	2.87	1.90
2	7.43	13.58	99.63	98.18
2	2.03	5.32	97.64	97.48
2	2.26	5.64	98.68	97.11
2	0.75	1.87	95.56	97.09
2	1.83	4.56	95.12	100.23
$\bar{X}_2 =$	2.62	6.19	97.33	98.02
CV(%) =	91.75	70.80	2.00	1.34
3	3.97	9.43	95.42	99.33
3	1.75	2.37	97.27	98.42
3	3.02	7.55	97.83	97.23
3	2.77	6.94	96.12	100.22
3	2.50	6.24	98.49	99.13
$\bar{X}_3 =$	2.80	6.50	97.03	98.87
CV(%) =	28.89	39.92	1.28	1.13
$\bar{X}_G^c =$	2.77	6.37	97.00	98.48
CV(%) =	80.10	64.32	2.02	1.43

^a NC = nivel de concentración.

^b Coeficiente de variación en tanto por ciento.

^c Media global (n = 15).

Tabla 10- Porcentajes de recuperación del CT para las diferentes eluciones y niveles de concentración ensayados.

NC ^a	Elución 1	Elución 2	Elución 3	Elución 4
1	NR ^b	NR	100.96	100.96
1	NR	NR	100.37	103.17
1	NR	NR	99.39	99.38
1	NR	NR	100.79	97.73
1	NR	NR	91.90	98.82
$\bar{X}_1 =$			98.68	100.01
CV(%) ^c =			3.89	2.12
2	NR	NR	99.16	100.55
2	NR	NR	100.25	101.15
2	NR	NR	98.42	102.93
2	NR	NR	100.14	102.04
2	NR	NR	95.12	99.34
$\bar{X}_2 =$			98.62	101.20
CV(%) =			2.12	1.36
3	NR	NR	99.69	101.03
3	NR	NR	98.20	99.09
3	NR	NR	99.74	98.11
3	NR	NR	100.11	99.08
3	NR	NR	96.37	99.59
$\bar{X}_3 =$			98.82	101.34
CV(%) =			1.57	1.28
$\bar{X}_G^d =$			98.71	100.85
CV(%) =			2.51	1.62

^a NC = nivel de concentración.

^b NR = no recuperado.

^c Coeficiente de variación en tanto por ciento.

^d Media global (n = 15).

Tabla 11- Porcentajes de recuperación del 7-CC para las diferentes eluciones y niveles de concentración ensayados.

NC ^a	Elución 1	Elución 2	Elución 3	Elución 4
1	65.16	90.39	103.06	102.69
1	65.25	90.53	97.85	99.76
1	70.88	96.94	98.42	102.31
1	58.83	83.68	99.11	98.11
1	67.01	91.59	103.82	103.53
$\bar{X}_1 =$ CV(%) ^b =	65.43 6.66	90.63 5.21	100.45 2.76	101.28 2.23
2	60.17	84.87	102.45	103.79
2	64.87	90.17	99.90	101.28
2	70.38	96.25	103.05	100.64
2	64.93	90.08	97.18	99.51
2	65.12	90.34	99.68	104.19
$\bar{X}_2 =$ CV(%) =	65.09 5.55	90.34 4.46	100.45 2.35	101.88 1.99
3	61.53	90.88	99.95	100.02
3	64.87	84.80	102.89	103.19
3	69.37	91.73	98.25	103.74
3	65.80	94.35	99.55	100.42
3	65.01	90.84	102.61	102.40
$\bar{X}_3 =$ CV(%) =	65.32 4.28	90.52 3.87	100.65 2.01	101.95 1.63
$\bar{X}_G^c =$ CV(%) =	65.58 5.17	90.50 4.21	100.52 2.22	101.70 1.85

^a NC = nivel de concentración.

^b Coeficiente de variación en tanto por ciento.

^c Media global (n = 15).

Tabla 12- Porcentajes de recuperación del 25-HC para las diferentes eluciones y niveles de concentración ensayados.

NC ^a	Elución 1	Elución 2	Elución 3	Elución 4
1	48.89	77.58	99.31	99.52
1	43.14	70.39	99.73	100.89
1	47.70	76.24	99.39	100.80
1	53.05	81.78	96.31	101.25
1	47.81	76.40	99.82	101.64
$\bar{X}_1 =$	48.06	76.48	98.91	100.82
CV(%) ^b =	7.33	5.33	1.49	0.79
2	42.44	71.34	98.46	100.40
2	48.07	76.80	97.43	100.47
2	49.22	78.53	98.97	101.03
2	49.52	78.98	98.00	99.60
2	51.56	80.54	100.99	100.52
$\bar{X}_2 =$	48.16	77.24	98.77	100.40
CV(%) =	7.14	4.61	1.38	0.51
3	42.37	72.65	98.60	100.47
3	47.07	76.45	98.27	101.09
3	49.80	77.38	98.91	100.95
3	49.84	76.50	98.57	100.34
3	48.52	79.77	100.72	100.77
$\bar{X}_3 =$	47.52	76.55	99.02	100.72
CV(%) =	6.51	3.34	0.99	0.31
$\bar{X}_G^c =$	47.91	76.76	98.90	100.65
CV(%) =	6.51	4.19	1.21	0.56

^a NC = nivel de concentración.

^b Coeficiente de variación en tanto por ciento.

^c Media global (n = 15).

Para saber si el porcentaje de recuperación, para cada elución y oxiesterol, dependía del nivel de concentración, se aplicó, en cada caso, el análisis de la variancia para grupos independientes. La aplicación de este análisis mostró, en todos los casos, diferencias no estadísticamente significativas. Así, se pudo concluir que la recuperación, en el caso de los OE estudiados, no presentaba, para ninguna de las eluciones, diferencias estadísticamente significativas en función de la concentración. De esta manera, se pudo considerar una recuperación global, independiente del nivel de concentración, para cada elución y OE.

Una vez hecha esta consideración, para saber si existían diferencias estadísticamente significativas en la recuperación del colesterol, α -CE, 7β -HC, 7-CC y 25-HC, en función de la elución utilizada, se aplicó el análisis de la variancia para grupos independientes. De la aplicación de este análisis resultó que las diferencias de recuperación, en función de la elución, fueron estadísticamente significativas en los 5 casos, siempre con un grado de significación de $P < 0.0001$. A continuación, para cada uno de estos 5 compuestos, y con el fin de determinar cuales eran las recuperaciones medias que diferían entre sí en función de la elución, se aplicó la prueba de Scheffé para contrastes a "posteriori" ($\alpha = 0.05$). Los resultados de la aplicación de esta prueba para cada uno de los 5 compuestos figuran en la tabla 13. La aplicación de la prueba de Scheffé es necesaria siempre que el análisis de la variancia señale existencia de diferencias estadísticamente significativas y queramos saber que medias difieren entre sí. Esto es debido a que un análisis de la variancia significativo sólo indica que, como mínimo, una de las medias difiere del resto; en cambio, la prueba de Scheffé, mediante comparaciones de las medias 2 a 2, por medio de contrastes, permite saber cuales son las medias que difieren estadísticamente entre sí.

Tabla 13-Resultados de los contrastes a "posteriori" para las recuperaciones medias del colesterol, α -CE, 7 β -HC, 7-CC y 25-HC en función de la elución (prueba de Scheffé, $\alpha = 0.05$).

Compuesto	E ^a	Elución 2	Elución 3	Elución 4
Colesterol	1	NS ^b	P=0.0026(1.14÷6.99) ^c	P=0.0007(1.57÷7.42)
	2		P<0.0001(3.24÷9.09)	P<0.0001(3.67÷9.52)
	3			NS
α -CE	1	P<0.0001(26.84÷36.61)	P<0.0001(59.31÷69.07)	P<0.0001(60.10÷69.86)
	2		P<0.0001(27.58÷37.34)	P<0.0001(28.37÷38.13)
	3			NS
7 β -HC	1	P=0.0053(0.84÷6.36)	P<0.0001(91.47÷96.99)	P<0.0001(92.94÷98.47)
	2		P<0.0001(87.87÷93.39)	P<0.0001(89.34÷94.87)
	3			NS
7-CC	1	P<0.0001(22.12÷28.31)	P<0.0001(32.15÷38.33)	P<0.0001(33.34÷39.52)
	2		P<0.0001(6.93÷13.11)	P<0.0001(8.12÷14.30)
	3			NS
25-HC	1	P<0.0001(26.38÷31.30)	P<0.0001(48.52÷53.45)	P<0.0001(50.27÷55.20)
	2		P<0.0001(19.68÷24.60)	P<0.0001(21.43÷26.36)
	3			NS

^a E = elución

^b La diferencia entre las recuperaciones medias de este compuesto para estas dos eluciones no es estadísticamente significativa (NS = no significativa).

^c P = grado de significación del contraste, entre paréntesis figura el intervalo de confianza de de este contraste.

En la tabla 13, podemos observar que las medias de recuperación de las eluciones 3 y 4, para los 4 OE, fueron claramente superiores a las de las eluciones 1 y 2. Esto es debido a que en las eluciones 1 y 2 estos 4 OE quedan altamente retenidos en el cartucho de gel de sílice, al no presentar estas dos secuencias de elución la polaridad suficientemente alta para eluir estos compuestos a través del cartucho. Por otro lado, para ninguno de los 4 OE las recuperaciones medias de las eluciones 3 y 4 difirieron entre sí. El colesterol presentó, para las eluciones 3 y 4, recuperaciones medias inferiores a las de las eluciones 1 y 2. Por otro lado, las recuperaciones medias, para este compuesto, de las eluciones 3 y 4 no difirieron entre sí, cosa que tampoco hicieron las recuperaciones medias, para el mismo compuesto, de las eluciones 1 y 2. Este hecho es interesante ya que el colesterol puede interferir en la determinación cromatográfica del 7α -HC, compuesto que en las columnas capilares con fase estacionaria 100 % metil silicona (fase estacionaria que presenta la columna usada por nosotros) eluye inmediatamente antes o después del colesterol (Addis *et al.*, 1989; Missler *et al.*, 1985; Nawar *et al.*, 1991; Park y Addis, 1985a, 1986a, 1987, 1992; Yan y White, 1990). Según estos resultados se pudo concluir que las eluciones 3 y 4 presentan ventajas respecto a las eluciones 1 y 2, ya que recuperan mayor proporción de OE y menor de colesterol.

Para el caso particular del CT, en que las eluciones 1 y 2 no recuperaron este compuesto al quedar totalmente retenido en el cartucho, se aplicó, para saber si existían diferencias estadísticamente significativas entre las recuperaciones medias de las eluciones 3 y 4, la prueba de la t de Student-Fisher para grupos independientes. La aplicación de esta prueba nos permitió concluir que el CT se recuperaba en mayor proporción con la elución 4 que con la 3 ($P=0.0009$). El intervalo de confianza (95%) de la diferencia entre estos 2 grupos nos permite afirmar que la elución 4, en media, recupera entre un 0.58 y un 3.72 % más de CT que la elución 3. Esta mayor recuperación con la elución 4 es debida a la mayor polaridad de los disolventes empleados en ella.

La mayor recuperación del CT por parte de la elución 4 junto con el hecho de que esta elución presentara mayor precisión (menor coeficiente de variación en %, $n = 15$) que la elución 3 para los 5 OE fueron los motivos que nos llevaron a la elección de esta elución para la realización del resto del trabajo.

Todos estos resultados, de forma resumida, se expresan gráficamente en la figura 12 .

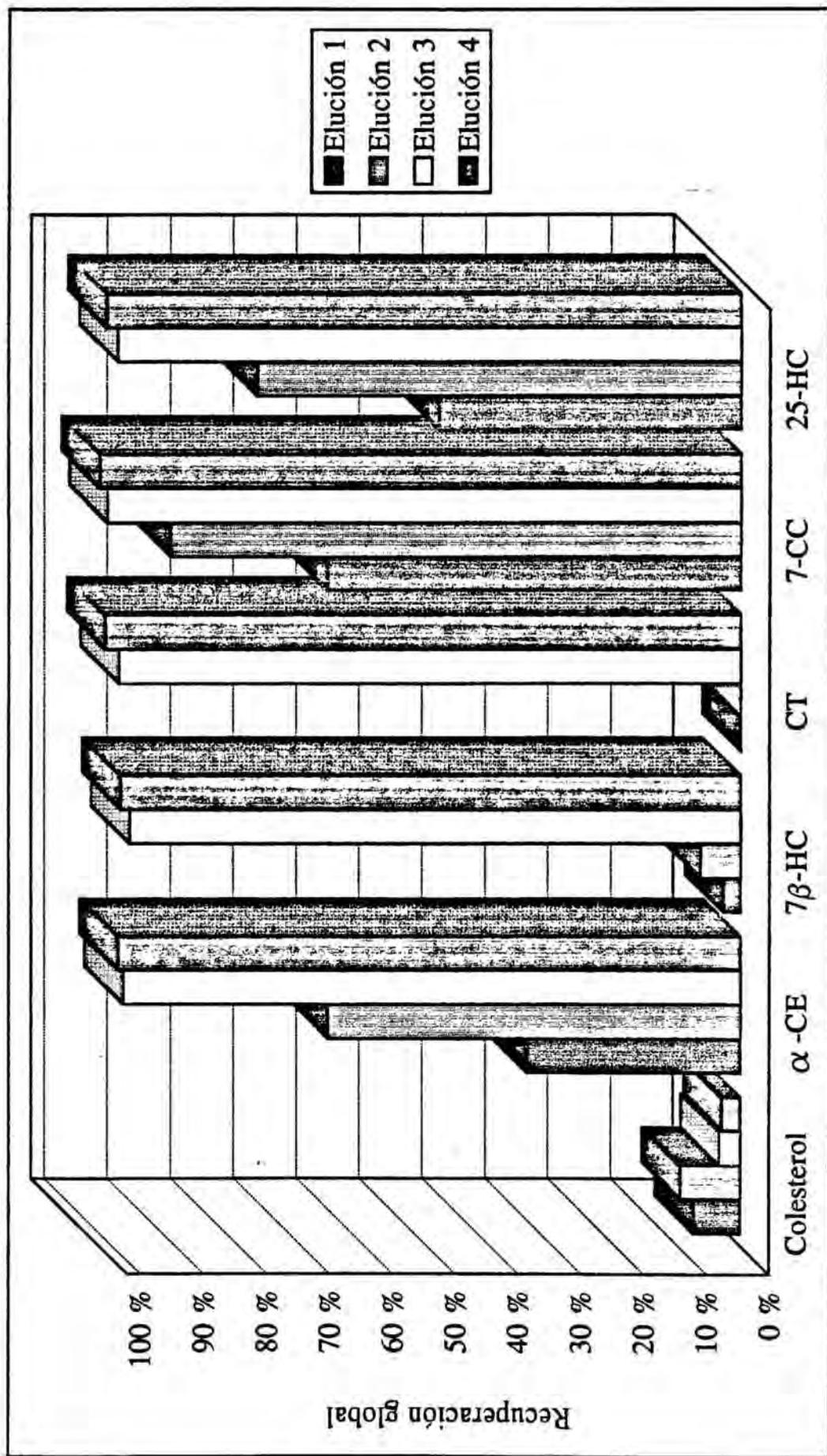


Figura 12-Recuperaciones globales del colesterol y de los diferentes OE para las 4 eluciones.

Los resultados de recuperación obtenidos para los diferentes OE con las diferentes eluciones se pueden explicar a partir de la polaridad de estos compuestos, que es creciente en el sentido: colesterol < CEs < 7-CC < 7-HCs < CT (Csallany *et al.*, 1989; Csiky, 1982; Fontana *et al.*, 1992; Nourooz-Zadeh y Appelqvist, 1987). Así, para las eluciones 1 y 2 se recuperan en menor grado los compuestos más polares, hasta el punto de que el CT ni tan solo lo hace. No obstante, el 7-CC, para las eluciones 1 y 2, se recupera más que el α -CE y que el 25-HC, lo cual no está de acuerdo con la escala de polaridades, anteriormente citada para los OE.

3.1.5. RECUPERACIÓN DE LOS OXIESTEROLES Y DE ALGUNOS ESTEROLES VEGETALES A TRAVÉS DEL CARTUCHO DE GEL DE SÍLICE CON LA ELUCIÓN 4.

Con posterioridad al estudio descrito anteriormente, y con la finalidad de saber si se podía aplicar la elución 4 para la determinación de OE en leches maternizadas en polvo (estudio que se venía realizando paralelamente), se planteó el estudio que se describe a continuación. Este estudio se realizó con el fin de averiguar si los esteroides vegetales se recuperaban a través del cartucho de gel de sílice con esta elución, pues, estas leches maternizadas presentaban en su composición grasas vegetales.

En el estudio se utilizaron 3 niveles de concentración y se estudiaron, además de los 5 OE del estudio anterior, el β -sitosterol (S) y el estigmasterol (E). Estos 7 patrones se dividieron en 2 grupos, un grupo A formado por: α -CE, estigmasterol, CT, 7-CC y 25-HC ; y otro B formado por: 7 β -HC y β -sitosterol (tabla 14). Esto se hizo así para evitar solapamientos entre picos de patrones, ya que los derivados silanizados del α -CE, 7 β -HC y estigmasterol se presentaban en el cromatograma con este orden y con tiempos de retención (TR) muy similares.

Tabla 14-Pesos en μg de los diferentes patrones a cada nivel de concentración.

Nivel de concentración	GRUPO A					GRUPO B	
	α -CE ^a	E	CT	7-CC	25-HC	7 β -HC	S
Nivel 1	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	5	2.5
Nivel 2	5	5	5	5	5	10	5
Nivel 3	10	10	10	10	10	20	10

^a Símbolos: α -CE (5,6 α -epoxi-5 α -colestano-3 β -ol), E (estigmasta-5,22-dien-3 β -ol), CT (5 α -colestano-3 β ,5,6 β -triol), 7-CC (3 β -hidroxicolest-5-en-7-ona), 25-HC (colest-5-en-3 β ,25-diol), 7 β -HC (colest-5-en-3 β ,7 β -diol) y S (estigmast-5-en-3 β -ol).

La elución se llevó a cabo de la manera que se ha descrito en el apartado anterior, con la salvedad de que se utilizaron dos PI, uno el 19-HC (25 μg) añadido antes de la elución a través del cartucho y otro el 5 α -colestano (25 μg) añadido después de la elución a través del cartucho. El paso de los diferentes eluyentes a través del cartucho de gel de sílice se realizó, a una velocidad de aproximadamente 7 ml/min, mediante la aplicación de presión con una jeringa.

Se hicieron 5 repeticiones para cada nivel de concentración, resultando para cada grupo un total de 15 repeticiones. Los resultados de recuperación obtenidos para cada patrón, calculados utilizando el 5 α -colestano como PI figuran en la tabla 15. En esta tabla los patrones se ordenan de menor a mayor TR independientemente del grupo a que fueron asignados. El cálculo se hizo con este patrón interno para que los resultados fueran totalmente comparables con los del apartado anterior.

De esta manera, con este estudio, además de los datos de recuperación de los dos esteroides vegetales, se obtuvieron más datos sobre la recuperación del α -CE, 7 β -HC, CT, 7-CC y 25-HC a través del cartucho de gel de sílice con la elución 4.

Tabla 15- Porcentajes de recuperación a los 3 niveles de concentración ensayados para los diferentes patrones con la elución 4.

NC ^a	α -CE ^b	7 β -HC	E	S	CT	7-CC	25-HC
1	97.10	103.61	3.64	3.04	103.60	103.20	98.85
1	102.35	99.32	3.98	2.22	102.43	97.46	99.66
1	102.47	102.74	1.99	4.41	97.50	102.96	96.71
1	102.20	97.96	2.15	5.90	97.40	101.73	95.60
1	97.16	97.25	4.08	4.85	96.39	101.26	101.04
$\bar{X}_1 =$	100.26	100.12	3.17	4.08	99.46	101.32	98.37
CV(%) ^c =	2.85	2.85	32.06	35.86	3.31	2.28	2.24
2	98.47	103.73	3.97	4.80	98.38	103.17	99.88
2	102.95	97.58	3.98	4.61	97.02	102.19	98.03
2	98.00	100.71	3.76	3.41	97.35	99.98	100.03
2	102.41	101.70	2.17	3.03	102.03	102.41	96.97
2	102.34	99.83	2.33	4.81	102.09	98.09	99.02
$\bar{X}_2 =$	100.83	100.71	3.24	4.13	99.38	101.17	98.79
CV(%) =	2.37	2.56	28.11	20.56	2.52	2.07	1.31
3	99.74	100.51	3.26	4.13	99.59	100.55	98.54
3	99.46	98.62	2.64	4.24	99.08	103.13	97.62
3	100.14	100.08	3.42	3.88	98.11	100.62	99.33
3	100.94	100.73	3.83	3.97	99.09	100.50	98.35
3	102.59	98.26	2.47	4.53	101.70	103.13	98.00
$\bar{X}_3 =$	100.57	99.64	3.13	4.15	99.52	101.58	98.37
CV(%) =	1.25	1.13	17.99	6.05	1.34	1.39	0.65
$\bar{X}_G^d =$	100.56	100.18	3.18	4.12	99.45	101.36	98.51
CV(%) =	2.10	2.09	24.86	22.20	2.34	1.81	1.45

^a NC = nivel de concentración.

^b Símbolos: α -CE (5,6 α -epoxi-5 α -colestan-3 β -ol), 7 β -HC (colest-5-en-3 β ,7 β -diol), E (estigmasta-5 dien-3 β -ol), S (estigmast-5-en-3 β -ol), CT (5 α -colestan-3 β ,5,6 β -triol), 7-CC (3 β -hidroxicolest-5-e ona) y 25-HC (colest-5-en-3 β ,25-diol).

^c Coeficiente de variación en tanto por ciento.

^d Media global (n = 15).

Para saber si existían diferencias estadísticamente significativas entre los porcentajes de recuperación de cada patrón en función del nivel de concentración, se aplicó, para cada uno de ellos, el análisis de la variancia para grupos independientes. La aplicación de este análisis mostró, en todos los casos, diferencias no estadísticamente significativas. Así, se pudo concluir que la recuperación, en el caso de los patrones estudiados, no presentaba diferencias estadísticamente significativas en función de la concentración. De esta manera, se pudo considerar una recuperación global para cada patrón, independiente del nivel de concentración.

Finalmente, tras esta consideración, se agruparon, para los 5 OE, los resultados de recuperación de este estudio con los del estudio anterior para la elución 4 y se hizo la media. Los resultados medios ($n = 30$) para la recuperación de cada OE y su CV (%) figuran en la tabla 16.

Tabla 16-Porcentajes medios de recuperación de los OE con la elución 4 ($n = 30$).

	α -CE ^a	7 β -HC	CT	7-CC	25-HC
$\bar{X} =$	99.71	99.36	100.15	101.53	99.58
CV(%) =	1.91	1.91	2.10	1.81	1.53

^a Símbolos: α -CE (5,6 α -epoxi-5 α -colestano-3 β -ol), 7 β -HC (colest-5-en-3 β ,7 β -diol), CT (5 α -colestano-3 β ,5,6 β -triol), 7-CC (3 β -hidroxicolest-5-en-7-ona) y 25-HC (colest-5-en-3 β ,25-diol).

3.2.CARACTERIZACIÓN Y COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS.

3.2.1.LINEALIDAD DE LA RESPUESTA Y FACTORES DE RESPUESTA RELATIVOS DEL COLESTEROL Y LOS OXIESTEROLES FRENTE AL DETECTOR DE IONIZACIÓN DE LLAMA CON DIFERENTES PATRONES INTERNOS.

Como ya se ha comentado anteriormente durante la puesta a punto del método analítico se utilizaron dos PI: 5 α -colestano y 19-HC.

La linealidad de la respuesta de los diferentes patrones frente al detector de ionización de llama (DIL) se comprobó mediante rectas de calibrado. Estas rectas de calibrado se efectuaron utilizando los dos PI y, a la vez, se realizaron en dos cromatógrafos distintos con condiciones cromatográficas muy similares. Las condiciones cromatográficas, para cada cromatógrafo, fueron las descritas en el apartado 2.5.4. (páginas 238-239). La ecuación de estas rectas de calibrado nos viene dada por la recta de regresión de y (A_{px}/A_{pi}) sobre x (P_{px}/P_{pi}) con fórmula $y = a + bx$. El coeficiente de determinación (r^2) de esta recta expresa la linealidad de la respuesta, además, a partir de esta recta se calcularon los FRR según la fórmula siguiente:

$$FRR = \frac{P_{px} \cdot A_{pi}}{A_{px} \cdot P_{pi}}$$

P_{px} = peso patrón problema;

P_{pi} = peso patrón interno;

A_{px} = área patrón problema;

A_{pi} = área patrón interno.

De todas las rectas de calibrado determinadas, las que se efectuaron en el mismo cromatógrafo y con el mismo PI presentaron ecuaciones similares y los FRR que se calcularon a partir de ellas también lo fueron. Por otro lado, con el 19-HC como PI sólo se trabajó en uno de los cromatógrafos. Así, de este modo, en este apartado sólo figuran los resultados de tres de estas rectas para cada patrón, que fueron las más representativas. Dos de estas rectas se realizaron con el 5 α -colestano como PI, una en el cromatógrafo Perkin Elmer Sigma 2000 (recta 1) y la otra en el Perkin Elmer Autosystem (recta 2). La recta 3, en la que se usó el 19-HC como PI, se efectuó en el Perkin Elmer Autosystem.

Los pesos de cada patrón que se silanizaron (con 50 μ l de piridina + 50 μ l de Sylon BTZ) e inyectaron para cada punto de estas 3 rectas de calibrado figuran en la tabla 17. Para las rectas 1 (R_1) y 3 (R_3) se hicieron 5 repeticiones, con inyección por duplicado, de cada punto. Para la recta 2 (R_2) se hicieron 4 repeticiones, con inyectada por duplicado, de cada punto.

Para las tres rectas la cantidad de patrón interno utilizada fue de 25 μg . Cabe tener en cuenta que cuando se habla de recta 1, 2 o 3, se hace referencia, en cada caso, realmente a seis rectas, una para cada uno de los patrones utilizados (colesterol, α -CE, 7 β -HC, CT, 7-CC y 25-HC).

La linealidad de la respuesta (r^2) y los FRR con su CV vienen reflejados en la tabla 18 para los diferentes patrones. En esta tabla, además, se reflejan la pendiente (b) y la ordenada en el origen (a) de las rectas de regresión ($y = a + bx$) de los diferentes patrones.

Tabla 17-Peso en μg de los diferentes patrones para cada punto de las rectas de calibrado.*

Puntos de la recta	Recta		
	R ₁	R ₂	R ₃
P ₁	0.5	0.6	—
P ₂	1	1.2	—
P ₃	2.5	2.5	2.5
P ₄	5	5	5
P ₅	10	10	10
P ₆	20	20	20
P ₇	30	—	—

* Válido para los patrones del colesterol, α -CE, 7 β -HC, CT, 7-CC y 25-HC.

Tabla 18-Pendiente (b) y ordenada en el origen (a) de las diferentes rectas de regresión, coeficiente de determinación de estas rectas, FRR y su CV.

Recta	Compuesto	n	a*	b*	r ^{2a}	FRR(CV) ^b
R ₁	Colesterol	35	0.022	1.022	0.9968	0.876(6.15)
	α-CE ^c	35	0.008	0.943	0.9973	1.030(4.14)
	7β-HC	35	0.046	1.007	0.9985	0.979(3.31)
	CT	35	0.010	0.984	0.9977	0.985(6.02)
	7-CC	35	0.001	0.801	0.9929	1.242(6.07)
	25-HC	35	0.015	0.994	0.9974	0.941(5.46)
R ₂	Colesterol	24	0.012	1.021	0.9988	0.883(6.12)
	α-CE	24	0.003	1.065	0.9990	0.899(6.02)
	7β-HC	24	0.003	0.811	0.9999	1.192(3.03)
	CT	24	-0.006	1.457	0.9978	0.690(6.06)
	7-CC	24	-0.015	1.387	0.9950	0.762(6.04)
	25-HC	24	-0.009	1.338	0.9957	0.764(5.88)
R ₃	Colesterol	20	0.061	0.997	0.9915	0.984(5.51)
	α-CE	20	-0.059	0.871	0.9935	1.181(5.69)
	7β-HC	20	0.051	0.753	0.9968	1.299(6.65)
	CT	20	-0.129	1.268	0.9915	0.822(6.12)
	7-CC	20	-0.108	1.122	0.9950	0.993(6.31)
	25-HC	20	-0.031	1.274	0.9961	0.801(6.22)

* La recta de regresión de y (A_{px}/A_{pi}) sobre x (P_{px}/P_{pi}) presenta la ecuación $y = a + bx$ en donde a es la ordenada en el origen y b la pendiente.

^a Coeficiente de determinación.

^b Factores de respuesta relativos, entre paréntesis figura su coeficiente de variación en tanto por ciento.

^c Símbolos: α-CE (5,6α-epoxi-5α-colestan-3β-ol), 7β-HC (colest-5-en-3β,7β-diol), CT (5α-colestan-3β,5,6β-triol), 7-CC (3β-hidroxicolest-5-en-7-ona) y 25-HC (colest-5-en-3β,25-diol).

Como podemos observar en la tabla 18 la linealidad de la respuesta de los diferentes patrones frente al DIL es buena en todos los casos. Además, debemos decir que se comprobó la existencia de linealidad para todos los patrones hasta la concentración de $55 \mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ en la mezcla silanizada. En cuanto a los FRR se observa que, para las rectas realizadas con 5α -colestano como PI, existe una diferencia en función del cromatógrafo utilizado. Como posible causa de ello podríamos señalar la diferencia entre las condiciones cromatográficas, que, aunque similares, difieren en algún punto. Al trabajar con partición (split), una de las causas podría ser la discriminación, aunque este problema sólo ha sido apuntado para la determinación de OE por Park y Addis (1992). No obstante, esto no está de acuerdo con los resultados más o menos concordantes que obtuvieron Park y Addis (1985a) y Van de Bovenkamp *et al.* (1988), para estos FRR, en sendos estudios en donde se realizaba una determinación de los OE por cromatografía de gases, previa silanización, utilizando como patrón interno el 5α -colestano. En nuestro caso, los FRR calculados a partir de la recta 1 presentan una buena concordancia con los de estos 2 trabajos anteriores, cosa que no hacen los FRR procedentes de la recta 2.

Pie *et al.* (1990), en un trabajo en donde se determinaron diferentes OE por cromatografía de gases tras previa silanización, calcularon los FRR de estos OE utilizando como patrón interno el 19-HC. Si comparamos los factores dados por estos autores en este trabajo y los que obtuvimos en nuestro estudio usando este mismo PI (recta 3), se puede observar que no existe una gran concordancia entre resultados.

También en relación con los FRR de los OE en un estudio de Maerker y Jones (1992) se calcularon estos factores utilizando como patrón interno el desmosterol (colesta-5,24-dien-3 β -ol). En este estudio los OE se determinaron por cromatografía de gases sin previa derivatización. Los FRR obtenidos al trabajar con cromatografía de gases en los trabajos citados figuran en la tabla 19.

Tabla 19-FRR del colesterol y de los OE obtenidos por diversos autores.

Compuesto	Nawar <i>et al.</i> , (1991) ^a	Maerker y Jones (1992) ^b	Park y Addis (1985a) ^c	Pie <i>et al.</i> , (1990)	Van de Bovenkamp <i>et al.</i> , (1988) ^e
Colesterol	0.74	0.97	1.00	0.92 ^d	—
α -CE ^e	0.85	1.05	1.13	1.10 ^f	1.23
7 β -HC	0.86	1.14	0.98	0.99 ^f	0.93
CT	—	1.36	1.03	1.13 ^f	1.07
7-CC	0.91	1.11	1.13	1.20 ^f	1.10
25-HC	—	—	0.98	1.14 ^f	0.93

^a Patrón interno 5 α -androstan-3 β -ol-17-ona. Patrones silanizados.

^b Patrón interno desmosterol. Patrones sin derivatizar.

^c Patrón interno 5 α -colestano. Patrones silanizados.

^d Patrón interno 5 α -colestano-3 β -ol (colestanol). Patrones silanizados.

^e Símbolos: α -CE (5,6 α -epoxi-5 α -colestano-3 β -ol), 7 β -HC (colest-5-en-3 β ,7 β -diol), CT (5 α -colestano-3 β ,5,6 β -triol), 7-CC (3 β -hidroxicolest-5-en-7-ona) y 25-HC (colest-5-en-3 β ,25-diols).

^f Patrón interno 19-hidroxicoolesterol. Patrones sin silanizar.

Si consideramos los datos bibliográficos de las 3 últimas columnas de la tabla 19 y los resultados que se obtuvieron en nuestro estudio con la recta 1 para los FRR de los OE, podemos concluir que estos FRR presentan valores próximos a la unidad, siendo los factores del α -CE y el 7-CC los que más se alejan de este valor unitario.

También se refieren otros datos de linealidad (Park y Addis, 1985b; Fillion y Zee, 1991) y de FRR (Park y Addis, 1985b) en algunos de los estudios en los que lo OE son determinados por CLAE.

3.2.2.COMPARACIÓN DE LOS TRES MÉTODOS ANALÍTICOS: ESTUDIO DE SU PRECISIÓN Y RECUPERACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE OXIESTEROLES.

Cuando se realiza un número elevado de determinaciones con un mismo método analítico sobre una misma muestra, los resultados obtenidos no son idénticos, pero siempre se distribuyen alrededor de un valor medio. La dispersión de los resultados alrededor del este

valor medio nos da idea de la precisión de este método, así cuanto mayor es la dispersión (mayor variabilidad) menor es la precisión. En nuestro estudio se dio como medida de dispersión el CV en tanto por ciento. Existen dos tipos de precisión: la precisión intralaboratorio o repetibilidad y la precisión interlaboratorio o reproducibilidad. La repetibilidad es la expresión de la precisión, cuando un mismo analista aplica repetidamente un método sobre una misma muestra, constituyendo una serie de análisis, en el mismo laboratorio y con el mismo material y reactivos. La reproducibilidad, en cambio, es la expresión de la precisión, cuando el método se aplica en condiciones preestablecidas por varios laboratorios (Linden, 1978). En nuestro estudio cuando se habla de precisión siempre se hace referencia a la intralaboratorio que fue la única que se determinó.

A lo largo del trabajo, tanto la precisión intralaboratorio como la recuperación de los tres métodos se determinaron en tres ocasiones. En cada una de ellas se realizaron pequeñas modificaciones en los métodos con el fin de mejorar su precisión.

Inicialmente, los métodos analíticos se llevaron a cabo según se describe en el apartado 2.5., partiendo de 0.45 g de huevo en polvo, usando el 5 α -colestano como PI y utilizando el cromatógrafo Perkin Elmer Sigma 2000 para la determinación cromatográfica.

3.2.2.1.DETERMINACIÓN DE LA PRECISIÓN.

La precisión intralaboratorio de cada uno de los tres métodos propuestos para el análisis de OE se determinó realizando un total de 10 determinaciones sobre una misma muestra de huevo en polvo. Los análisis los efectuó un único analista, que los realizó en el mismo laboratorio, en días sucesivos y empleando el mismo material y reactivos para todos ellos. En estos análisis se intentaron determinar un total de 5 OE que fueron: α -CE, 7 β -HC, CT, 7-CC y 25-HC, dado que figuran entre los más frecuentemente detectados en alimentos; no obstante, no se detectó la presencia de 25-HC en la muestra con ninguno de los tres métodos.

Los resultados de cada una de las 10 determinaciones para los 4 OE detectados, así como su valor medio y CV, para los métodos 1, 2 y 3, figuran en las tablas 20, 21 y 22, respectivamente. La tabla 23 resume los valores medios y CV de estas determinaciones para los tres métodos analíticos.

Tabla 20-Precisión del método 1 (ppm).

Repetición	α -CE ^a	7 β -HC	CT	7-CC
1	3.66	34.19	2.34	8.74
2	6.71	54.79	5.18	12.62
3	6.14	48.93	2.53	10.12
4	7.59	54.49	3.41	12.31
5	8.25	55.34	6.21	14.23
6	4.96	38.02	5.13	9.49
7	10.40	78.38	4.05	19.26
8	8.84	64.37	2.39	16.19
9	10.83	80.55	4.70	17.53
10	10.00	71.59	2.92	15.78
$\bar{X} =$	7.74	58.06	3.89	13.62
CV(%) ^b =	30.82	27.09	35.29	26.19

^a Símbolos: α -CE (5,6 α -epoxi-5 α -colestán-3 β -ol), 7 β -HC (colest-5-en-3 β ,7 β -diol), CT (5 α -colestán-3 β ,5,6 β -triol) y 7-CC (3 β -hidroxicolest-5-en-7-ona).

^b Coeficiente de variación en tanto por ciento.

Tabla 21-Precisión del método 2 (ppm).

Repetición	α -CE ^a	7 β -HC	CT	7-CC
1	8.23	66.99	2.67	21.41
2	8.55	73.52	3.26	25.65
3	7.11	56.23	2.52	18.63
4	8.75	69.48	2.32	23.74
5	7.11	60.33	4.41	24.61
6	8.71	80.82	3.97	28.08
7	10.32	68.88	2.94	22.48
8	8.71	70.75	3.06	24.48
9	8.67	71.30	1.50	22.58
10	8.70	72.81	3.43	22.51
$\bar{X} =$	8.49	69.11	3.01	23.42
CV(%) ^b =	10.73	9.95	27.63	10.91

^a Símbolos: α -CE (5,6 α -epoxi-5 α -colestán-3 β -ol), 7 β -HC (colest-5-en-3 β ,7 β -diol), CT (5 α -colestán-3 β ,5,6 β -triol) y 7-CC (3 β -hidroxicolest-5-en-7-ona).

^b Coeficiente de variación en tanto por ciento.

Tabla 22-Precisión del método 3 (ppm).

Repetición	α -CE ^a	7 β -HC	CT	7-CC
1	7.66	45.12	3.03	16.70
2	8.50	51.76	2.92	19.08
3	8.79	52.55	2.94	19.26
4	8.34	56.09	3.43	19.35
5	8.63	52.33	3.77	18.58
6	7.83	47.66	3.94	17.48
7	6.56	47.23	4.91	18.65
8	8.38	51.64	3.49	19.00
9	7.48	56.16	5.09	19.44
10	9.09	59.31	5.51	21.36
\bar{X} =	8.13	51.99	3.90	18.89
CV(%) ^b =	9.23	8.53	24.23	6.45

^a Símbolos: α -CE (5,6 α -epoxi-5 α -colestan-3 β -ol), 7 β -HC (colest-5-en-3 β ,7 β -diol), CT (5 α -colestan-3 β ,5,6 β -triol) y 7-CC (3 β -hidroxicolest-5-en-7-ona).

^b Coeficiente de variación en tanto por ciento.

Tabla 23-Precisión de los métodos 1, 2 y 3 (ppm).

	α -CE ^a	7 β -HC	CT	7-CC
\bar{X}_1^b =	7.74	58.06	3.89	13.62
CV(%) ^c =	30.82	27.09	35.29	26.19
\bar{X}_2^d =	8.49	69.11	3.01	23.42
CV(%) =	10.73	9.95	27.63	10.91
\bar{X}_3^e =	8.13	51.99	3.90	18.89
CV(%) =	9.23	8.53	24.23	6.45

^a Símbolos: α -CE (5,6 α -epoxi-5 α -colestan-3 β -ol), 7 β -HC (colest-5-en-3 β ,7 β -diol), CT (5 α -colestan-3 β ,5,6 β -triol) y 7-CC (3 β -hidroxicolest-5-en-7-ona).

^b Media para el método 1 (n = 10).

^c Coeficiente de variación en tanto por ciento.

^d Media para el método 2 (n = 10).

^e Media para el método 3 (n = 10).

En la tabla 23 se observa que la precisión de estos tres métodos analíticos crece en el siguiente orden: método 1 < método 2 < método 3. Esta mayor precisión del método 3 es seguramente debida a que en este método la purificación aplicada fue más exhaustiva que la aplicada en los otros 2 métodos. Este hecho viene ilustrado en los cromatogramas que se obtienen con cada método (figura 13).

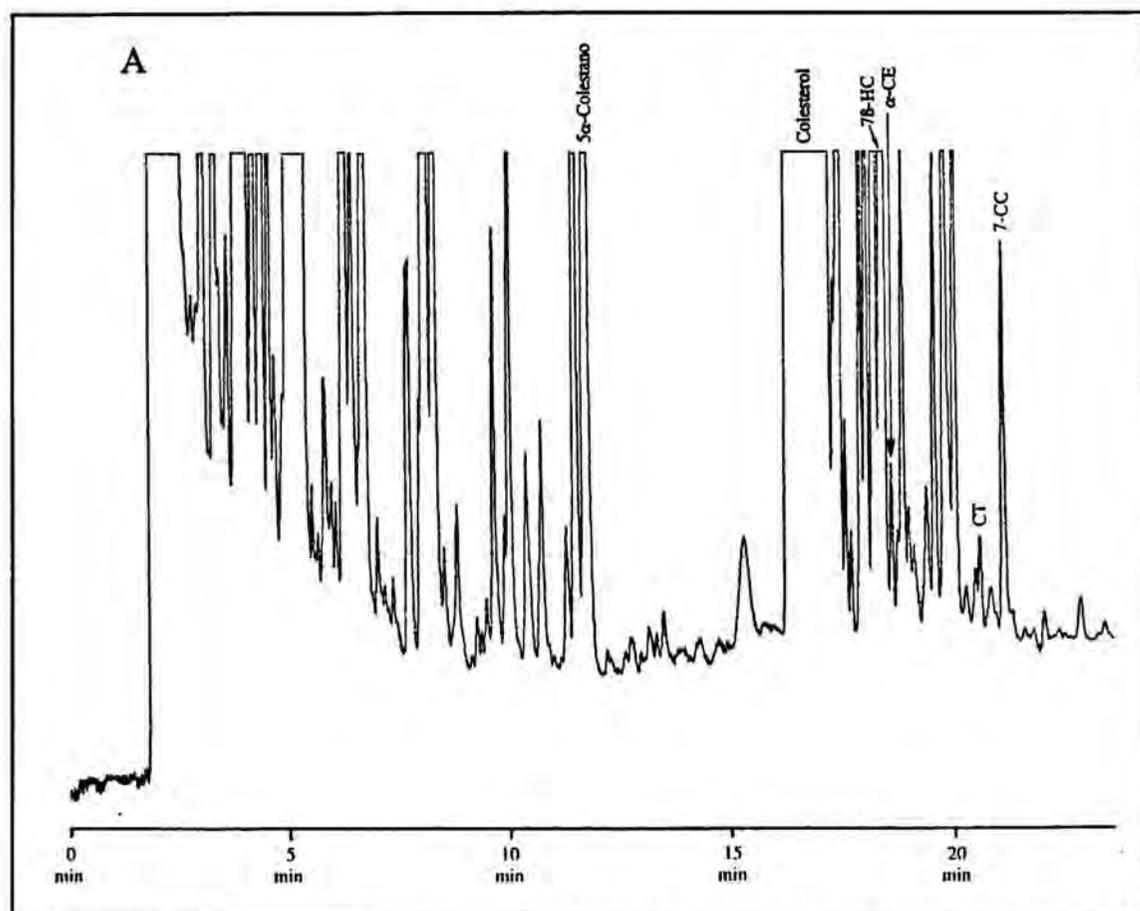


Figura 13-Cromatogramas obtenidos con cada uno de los métodos analíticos.
(A) Método 1. (B) Método 2. (C) Método 3.



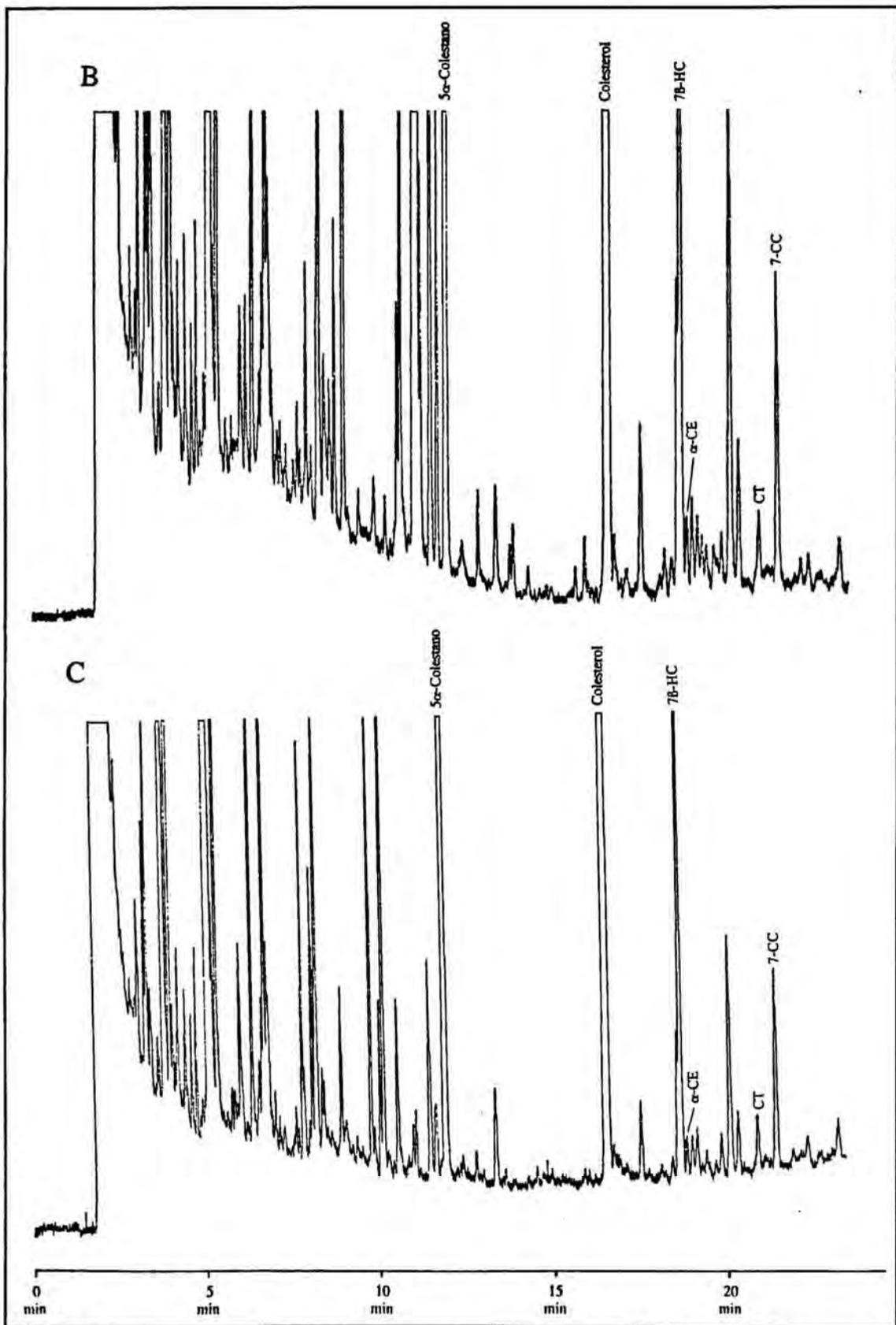


Figura 13-cromatogramas obtenidos con cada uno de los métodos analíticos ensayados. (A) Método 1. (B) Método 2. (C) Método 3.

3.2.2.2.DETERMINACIÓN DE LA RECUPERACIÓN.

A continuación se determinó la recuperación de estos tres métodos analíticos, para ello sobre la muestra de huevo utilizada para la determinación de la precisión se añadieron patrones de los 5 OE a determinar. Se trabajó con tres niveles de adición y se realizaron 5 réplicas de cada nivel, resultando un total de 15 réplicas por método. Los niveles de adición para cada patrón fueron 2.5, 5 y 10 μg .

Los resultados de recuperación a los tres niveles de adición de los 5 OE para los métodos 1, 2, y 3 figuran en las tablas 24, 25 y 26, respectivamente.

Tabla 24-Recuperaciones de los diferentes OE a tres niveles de adición para el método 1.

NA ^a	α -CE ^b	7 β -HC	CT	7-CC	25-HC
2.5	58.50	112.91	74.76	91.92	37.66
2.5	71.74	121.53	84.65	126.94	65.15
2.5	46.98	60.77	46.18	62.99	36.70
2.5	72.83	139.24	82.56	110.95	53.18
2.5	60.51	65.77	81.15	69.07	36.12
$\bar{X}_{2.5} =$	62.11	100.04	73.86	92.37	45.76
CV(%) ^c =	17.11	34.91	21.53	29.38	28.32
5	66.87	104.36	63.36	81.71	53.51
5	66.73	76.58	67.94	83.71	52.65
5	59.75	77.99	73.64	74.33	82.21
5	76.75	110.15	76.95	117.15	80.44
5	60.43	109.70	50.92	94.64	48.91
$\bar{X}_5 =$	66.10	95.76	66.56	90.31	63.54
CV(%) =	10.35	17.78	15.30	18.46	25.70
10	55.47	84.33	66.85	64.94	68.99
10	52.94	64.16	58.08	53.86	47.46
10	60.92	106.17	52.31	78.64	50.18
10	69.61	108.12	59.13	87.62	59.00
10	61.83	105.16	54.66	77.45	54.64
$\bar{X}_{10} =$	60.15	95.59	58.21	72.50	56.06
CV(%) =	10.73	20.38	9.52	18.19	15.09
$\bar{X}_G^d =$	62.79	96.46	66.21	85.06	55.12
CV(%) =	12.76	24.16	18.78	24.23	25.76

^a NA = nivel de adición.

^b Símbolos: α -CE (5,6 α -epoxi-5 α -colestán-3 β -ol), 7 β -HC (colest-5-en-3 β ,7 β -diol), CT (5 α -colestán-3 β ,5,6 β -triol), 7-CC (3 β -hidroxicolest-5-en-7-ona) y 25-HC (colest-5-en-3 β ,25-diol).

^c Coeficiente de variación en tanto por ciento.

^d Media global (n = 15).

Tabla 25-Recuperaciones de los diferentes OE a 3 niveles de adición para el método 2.

NA ^a	α -CE ^b	7 β -HC	CT	7-CC	25-HC
2.5	82.22	12.33	33.83	28.31	56.09
2.5	100.74	95.03	85.23	72.34	73.61
2.5	99.95	107.78	64.74	89.53	75.35
2.5	58.07	15.87	53.97	15.63	50.17
2.5	108.49	98.96	108.86	97.25	94.16
$\bar{X}_{2.5} =$	89.89	65.99	69.33	60.61	69.87
CV(%) ^c =	22.50	72.15	41.63	60.52	24.91
5	103.94	95.24	77.89	104.94	90.95
5	102.50	93.08	103.14	86.74	77.96
5	83.67	13.15	74.46	52.75	57.65
5	97.69	89.44	75.27	81.05	77.64
5	84.61	34.31	78.09	61.40	62.39
$\bar{X}_5 =$	94.48	65.04	81.77	77.38	73.32
CV(%) =	10.30	59.20	14.74	26.82	18.25
10	100.37	68.91	84.13	86.87	70.06
10	104.08	96.40	84.58	85.56	72.11
10	72.44	53.70	82.86	53.71	71.86
10	100.55	71.05	54.17	83.04	74.49
10	96.17	72.27	91.37	72.17	78.68
$\bar{X}_{10} =$	94.72	72.47	79.42	76.27	73.44
CV(%) =	13.48	21.15	18.26	18.19	4.53
$\bar{X}_G^d =$	93.03	67.84	76.84	71.42	72.21
CV(%) =	15.04	49.99	25.06	35.01	16.61

^a NA = nivel de adición.

^b Símbolos: α -CE (5,6 α -epoxi-5 α -colestán-3 β -ol), 7 β -HC (colest-5-en-3 β ,7 β -diol), CT (5 α -colestán-3 β ,5,6 β -triol), 7-CC (3 β -hidroxicolest-5-en-7-ona) y 25-HC (colest-5-en-3 β ,25-diol).

^c Coeficiente de variación en tanto por ciento.

^d Media global (n = 15).

Tabla 26-Recuperaciones de los diferentes OE a tres niveles de adición para el método 3.

NA ^a	α -CE ^b	7 β -HC	CT	7-CC	25-HC
2.5	78.23	67.83	68.15	64.22	59.77
2.5	58.91	49.02	47.85	59.84	50.10
2.5	86.86	62.51	41.85	71.85	64.67
2.5	92.95	74.31	50.69	84.04	79.31
2.5	65.69	56.67	42.41	48.62	69.72
$\bar{X}_{2.5} =$	76.53	62.07	50.19	65.71	64.71
CV(%) ^c =	18.56	15.76	21.35	20.16	16.86
5	68.84	67.90	62.49	61.92	72.55
5	61.63	62.10	43.76	65.64	61.75
5	113.67	73.83	57.31	81.07	70.36
5	79.91	83.09	61.85	68.77	73.34
5	62.02	59.78	69.05	85.99	65.96
$\bar{X}_5 =$	77.22	69.34	58.89	72.68	68.79
CV(%) =	28.07	13.59	16.03	14.24	7.08
10	59.93	60.30	62.94	72.47	60.29
10	48.15	57.05	54.83	64.36	45.91
10	52.93	65.58	47.85	63.31	51.04
10	50.56	52.27	65.52	78.29	62.33
10	62.55	66.85	58.00	69.06	62.96
$\bar{X}_{10} =$	54.82	60.41	57.83	69.50	56.51
CV(%) =	11.25	9.99	12.04	8.84	13.48
$\bar{X}_G^d =$	69.52	63.94	55.64	69.30	63.34
CV(%) =	25.68	13.92	16.88	14.45	14.59

^a NA = nivel de adición.

^b Símbolos: α -CE (5,6 α -epoxi-5 α -colestán-3 β -ol), 7 β -HC (colest-5-en-3 β ,7 β -diol), CT (5 α -colestán-3 β ,5,6 β -triol), 7-CC (3 β -hidroxicolest-5-en-7-ona) y 25-HC (colest-5-en-3 β ,25-diol).

^c Coeficiente de variación en tanto por ciento.

^d Media global (n = 15).

En estas tres últimas tablas se observa que existen diferencias entre las recuperaciones medias de un mismo OE para un determinado método a los diferentes niveles de adición. Para saber si estas diferencias eran estadísticamente significativas, se aplicó el análisis de la variancia para grupos independientes, para cada OE en cada método, en función del nivel de adición. De la aplicación de este análisis se dedujo que para todos los OE en todos los métodos las diferencias existentes entre las recuperaciones medias a los diferentes niveles de adición no eran estadísticamente significativas, así en todos los casos se consideró una media global de recuperación, que agrupaba los resultados de recuperación de un mismo OE para un mismo método a los diferentes niveles de adición.

En la tabla 27 se presentan las medias de recuperación de los diferentes OE por niveles de adición y globalmente para cada uno de los tres métodos.

Tabla 27-Recuperaciones medias para los tres métodos de los diferentes OE por niveles de adición y globalmente.

		α -CE ^a	7 β -HC	CT	7-CC	25-HC
M É	$\bar{X}_{2.5}^b =$	62.11	100.04	73.86	92.37	45.76
	CV(%) ^c =	17.11	34.91	21.53	29.38	28.32
T O	$\bar{X}_5^d =$	66.10	95.76	66.56	90.31	63.54
	CV(%) =	10.35	17.78	15.30	18.46	25.70
D O	$\bar{X}_{10}^e =$	60.15	95.59	58.21	72.50	56.06
	CV(%) =	10.73	20.38	9.52	18.19	15.09
1	$\bar{X}_G^f =$	62.79	96.46	66.21	85.06	55.12
	CV(%) =	12.76	24.16	18.78	24.23	25.76
M É	$\bar{X}_{2.5} =$	89.89	65.99	69.93	60.61	69.87
	CV(%) =	22.50	72.15	41.63	60.52	24.91
T O	$\bar{X}_5 =$	94.48	65.04	81.77	77.38	73.32
	CV(%) =	10.30	59.20	14.74	26.82	18.25
D O	$\bar{X}_{10} =$	94.72	72.47	79.42	76.27	73.44
	CV(%) =	13.48	21.15	18.26	18.19	4.53
2	$\bar{X}_G =$	93.03	67.84	76.84	71.42	72.21
	CV(%) =	15.04	49.99	25.06	35.01	16.61
M É	$\bar{X}_{2.5} =$	76.53	62.07	50.19	65.71	64.71
	CV(%) =	18.56	15.76	21.35	20.16	16.86
T O	$\bar{X}_5 =$	77.22	69.34	58.89	72.68	68.79
	CV(%) =	28.07	13.59	16.03	14.24	7.08
D O	$\bar{X}_{10} =$	54.82	60.41	57.83	69.50	56.51
	CV(%) =	11.25	9.99	12.04	8.84	13.48
3	$\bar{X}_G =$	69.52	63.94	55.64	69.30	63.34
	CV(%) =	25.68	13.92	16.88	14.45	14.59

^a Símbolos: α -CE (5,6 α -epoxi-5 α -colestan-3 β -ol), 7 β -HC (colest-5-en-3 β ,7 β -diol), CT (5 α -colestan-3 β ,5,6 β -triol), 7-CC (3 β -hidroxicolest-5-en-7-ona) y 25-HC (colest-5-en-3 β ,25-diol).

^b Media de recuperación para el nivel de adición de 2.5 μ g (n = 5).

^c Coeficiente de variación en tanto por ciento.

^d Media de recuperación para el nivel de adición de 5 μ g (n = 5).

^e Media de recuperación para el nivel de adición de 10 μ g (n = 5).

^f Media global de recuperación que agrupa los tres niveles de adición (n = 15).

En la tabla 27 se puede observar que, de forma general, en los tres métodos la variabilidad para la recuperación de los diferentes OE es mayor a los niveles de adición más bajos. En esta misma tabla, se puede observar que la recuperación de los OE es creciente en el sentido: método 3 < método 1 < método 2. Asimismo, también de esta tabla, se deduce que la variabilidad de las recuperaciones de los diferentes OE es creciente en el sentido: método 3 < método 1 < método 2.

De los resultados de precisión y recuperación obtenidos para estos tres métodos, se concluye que el método más fiable, por presentar una mayor precisión en la determinación y recuperación de los OE, fue el método 3; no obstante, la variabilidad que presentó este método fue bastante elevada y difícilmente pudo considerarse aceptable. En esta conclusión sólo se habla de precisión, ya que para los diferentes OE, en los diferentes métodos, las recuperaciones obtenidas distaron bastante del 100 %; sin embargo, una recuperación alejada del 100 %, cuando es precisa, se puede considerar aceptable, ya que permite corregir los resultados más fiabemente que una recuperación cercana al 100 %, pero menos precisa. Según este criterio, una recuperación precisa prima sobre una recuperación alta, aunque lo ideal, lógicamente, es obtener las dos cosas a la vez. Por otro lado, cabe destacar que parte de la variabilidad de los métodos 2 y 3 vino probablemente introducida por la dificultad que ofreció controlar, de forma exacta y precisa, la velocidad de elución a través del cartucho de gel de sílice (los diferentes eluyentes fueron aplicados al cartucho mediante una jeringa como se describe en el apartado 3.1.4., página 265).

3.2.2.3. ENSAYOS PARA LA MEJORA DE LA PRECISIÓN Y RECUPERACIÓN.

A la vista de estos resultados se planteó repetir la determinación de la precisión y recuperación para los tres métodos, introduciendo en ellos leves modificaciones para mejorar su precisión. Las modificaciones introducidas fueron 3. La primera consistió en partir de 0.65 g de muestra en lugar de los 0.45 g de los que se había partido anteriormente. Esto se hizo así, ya que se pensó que con ello aumentaría todavía más la precisión del método 3, al aplicarse en él una purificación bastante exhaustiva, mientras que en los otros dos métodos, en los que se trabajaba con purificaciones menos completas, posiblemente disminuiría la precisión. La segunda modificación consistió en que los niveles de adición de patrones fueron

5, 10 y 20 μg en lugar de 2.5, 5 y 10 μg , ya que se observó en la anterior determinación de la recuperación que la variabilidad para el nivel de adición de 2.5 μg era muy alta. La tercera modificación consistió en intentar controlar con la máxima exactitud y precisión posibles la velocidad de elución de los diferentes eluyentes a través del cartucho de gel de sílice (los diferentes eluyentes fueron aplicados al cartucho mediante una jeringa como se describe en el apartado 3.1.4., página 265).

Estas modificaciones junto con la mayor habilidad por parte del analista hicieron presumible la obtención de una mayor precisión en la determinación y recuperación de los OE, especialmente para el método 3.

Con las modificaciones descritas, se procedió a determinar la precisión y recuperación de la manera que se ha descrito anteriormente.

Los resultados de las 10 determinaciones que se realizaron con cada método para establecer su precisión figuran en las tablas 28, 29 y 30. En esta ocasión, a diferencia de la anterior, se detectó con los tres métodos la presencia de pequeñas cantidades de 25-HC, lo cual seguramente obedeció al mayor peso de muestra utilizado en esta ocasión, pudiendo también influir en ello, el hecho de que entre la primera determinación de la precisión y recuperación y esta segunda transcurrieron aproximadamente tres meses y la oxidación en la muestra de huevo en polvo fue avanzando.

En la tabla 31 figuran solamente los valores medios y CV de estas determinaciones para los tres métodos analíticos.

Tabla 28-Precisión del método 1 (ppm).

Repetición	α -CE ^a	7-HC	CT	7-CC	25-HC
1	8.38	77.16	12.33	19.89	1.23
2	8.77	79.90	12.76	20.58	1.66
3	7.31	68.62	10.91	18.07	1.39
4	8.17	75.75	12.08	19.27	1.55
5	9.42	84.91	13.55	22.23	1.97
6	8.12	75.91	11.92	19.56	1.51
7	8.98	81.86	13.11	21.10	1.69
8	9.75	87.19	14.18	22.42	2.29
9	7.23	65.80	10.55	16.99	1.16
10	9.47	86.32	13.83	22.31	1.79
$\bar{X} =$	8.56	78.34	12.52	20.24	1.62
CV(%) ^b =	10.25	9.18	9.59	9.12	21.02

^a Símbolos: α -CE (5,6 α -epoxi-5 α -colestán-3 β -ol), 7 β -HC (colest-5-en-3 β ,7 β -diol), CT (5 α -colestán-3 β ,5,6 β -triol), 7-CC (3 β -hidroxicolest-5-en-7-ona) y 25-HC (colest-5-en-3 β ,25-diol).

^b Coeficiente de variación en tanto por ciento.

Tabla 29-Precisión del método 2 (ppm).

Repetición	α -CE ^a	7 β -HC	CT	7-CC	25-HC
1	10.31	89.95	11.62	26.99	1.05
2	11.43	92.29	13.16	31.81	1.49
3	10.86	90.91	13.06	28.59	2.26
4	11.25	85.90	11.99	24.81	1.55
5	11.69	98.66	12.25	26.70	1.56
6	10.20	91.99	12.07	25.23	1.67
7	8.57	90.72	11.78	25.07	1.63
8	12.05	102.47	14.25	29.19	1.90
9	11.22	87.83	11.42	25.68	1.44
10	10.01	84.17	11.18	26.22	1.46
$\bar{X} =$	10.76	91.49	12.28	27.03	1.60
CV(%) ^b =	9.45	6.04	7.68	8.24	19.70

^a Símbolos: α -CE (5,6 α -epoxi-5 α -colestán-3 β -ol), 7 β -HC (colest-5-en-3 β ,7 β -diol), CT (5 α -colestán-3 β ,5,6 β -triol), 7-CC (3 β -hidroxicolest-5-en-7-ona) y 25-HC (colest-5-en-3 β ,25-diol).

^b Coeficiente de variación en tanto por ciento.

Tabla 30-Precisión del método 3 (ppm).

Repetición	α -CE ^a	7 β -HC	CT	7-CC	25-HC
1	9.89	73.71	13.44	22.36	1.99
2	9.82	74.70	10.70	20.13	1.25
3	8.16	75.01	11.42	19.64	1.62
4	9.93	78.80	11.79	23.40	1.76
5	9.17	74.54	12.57	23.65	1.59
6	8.89	72.95	11.87	21.68	1.85
7	8.65	73.29	11.18	20.66	1.10
8	9.02	76.18	11.13	23.57	1.59
9	8.34	77.04	12.54	20.28	1.51
10	7.99	69.60	10.77	20.45	1.56
\bar{X} =	8.99	74.58	11.74	21.58	1.58
CV(%) ^b =	8.00	3.36	7.53	7.23	16.58

^a Símbolos: α -CE (5,6 α -epoxi-5 α -colestán-3 β -ol), 7 β -HC (colest-5-en-3 β ,7 β -diol), CT (5 α -colestán-3 β ,5,6 β -triol), 7-CC (3 β -hidroxicolest-5-en-7-ona) y 25-HC (colest-5-en-3 β ,25-dioli).

^b Coeficiente de variación en tanto por ciento.

Tabla 31-Precisión de los métodos 1, 2 y 3 (ppm).

	α -CE ^a	7 β -HC	CT	7-CC	25-HC
\bar{X}_1^b =	8.56	78.34	12.52	20.24	1.62
CV(%) ^c =	10.25	9.18	9.59	9.12	21.02
\bar{X}_2^d =	10.76	91.49	12.28	27.03	1.60
CV(%) =	9.45	6.04	7.68	8.24	19.70
\bar{X}_3^e =	8.99	74.58	11.74	21.58	1.58
CV(%) =	8.00	3.36	7.53	7.23	16.58

^a Símbolos: α -CE (5,6 α -epoxi-5 α -colestán-3 β -ol), 7 β -HC (colest-5-en-3 β ,7 β -diol), CT (5 α -colestán-3 β ,5,6 β -triol), 7-CC (3 β -hidroxicolest-5-en-7-ona) y 25-HC (colest-5-en-3 β ,25-dioli).

^b Media para el método 1 (n = 10).

^c Coeficiente de variación en tanto por ciento.

^d Media para el método 2 (n = 10).

^e Media para el método 3 (n = 10).

De los resultados de la tabla 31 se deduce que el método 3 fue más preciso que el 2 y este último lo fue más que el 1.

Los resultados de recuperación de los 5 OE a los tres niveles de adición, en este caso 5, 10 y 20 μg , fueron para los métodos 1, 2 y 3 los que figuran, respectivamente, en las tablas 32, 33 y 34.

Tabla 32-Recuperaciones de los diferentes OE a tres niveles de adición para el método 1.

NA ^a	α -CE ^b	7-HC	CT	7-CC	25-HC
5	97.25	80.97	58.54	82.95	78.40
5	106.58	91.28	66.01	89.49	82.15
5	116.36	102.65	62.24	86.54	88.63
5	85.42	70.00	49.94	69.69	70.52
5	112.12	96.35	68.21	98.48	87.02
$\bar{X}_5 =$	103.55	88.25	60.99	85.43	81.34
CV(%) ^c =	11.98	14.64	11.79	12.31	8.94
10	99.28	84.60	60.54	76.91	76.69
10	103.74	89.10	62.65	87.58	80.58
10	86.54	75.79	53.57	76.65	67.26
10	96.65	84.47	59.30	81.74	75.07
10	111.21	97.91	66.52	95.88	86.64
$\bar{X}_{10} =$	99.48	86.37	60.52	83.75	77.25
CV(%) =	9.15	9.32	7.85	9.68	9.24
20	100.17	80.23	60.54	84.36	76.69
20	103.76	89.96	63.26	87.40	80.58
20	92.07	86.27	58.89	84.70	77.48
20	96.64	84.47	59.30	81.74	75.90
20	110.40	93.33	66.52	94.29	86.64
$\bar{X}_{20} =$	100.61	86.85	61.70	86.50	79.46
CV(%) =	6.94	5.80	5.17	5.54	5.53
$\bar{X}_G^d =$	101.21	87.16	61.07	85.23	79.35
CV(%) =	9.09	9.88	8.09	8.96	7.79

^a NA = nivel de adición.

^b Símbolos: α -CE (5,6 α -epoxi-5 α -colestán-3 β -ol), 7 β -HC (colest-5-en-3 β ,7 β -diol), CT (5 α -colestán-3 β ,5,6 β -triol), 7-CC (3 β -hidroxicolest-5-en-7-ona) y 25-HC (colest-5-en-3 β ,25-diol).

^c Coeficiente de variación en tanto por ciento.

^d Media global (n = 15).

Tabla 33-Recuperaciones de los diferentes OE a tres niveles de adición para el método 2.

NA ^a	α -CE ^b	7 β -HC	CT	7-CC	25-HC
5	113.14	97.04	86.04	87.8811	96.01
5	101.61	91.22	78.94	80.6072	90.25
5	108.01	92.13	82.49	89.2436	94.13
5	129.07	113.63	96.95	102.1832	107.45
5	104.08	81.37	73.69	74.2132	86.45
$\bar{X}_5 =$	111.18	95.08	83.62	86.83	94.86
CV(%) ^c =	9.81	12.44	10.45	12.09	8.37
10	109.14	96.07	84.19	88.0012	95.05
10	102.11	86.25	79.09	85.7284	93.29
10	123.17	110.69	93.25	96.4256	103.53
10	112.27	102.92	88.44	91.3952	99.85
10	105.07	91.34	78.54	76.092	87.41
$\bar{X}_{10} =$	110.35	97.45	84.70	87.53	95.83
CV(%) =	7.38	9.87	7.39	8.63	6.46
20	119.39	110.80	93.84	96.9104	102.69
20	107.88	94.54	82.14	88.5403	97.22
20	114.67	88.33	86.89	87.4391	95.79
20	101.95	95.84	82.43	82.3049	93.26
20	108.11	103.47	88.73	91.2511	97.77
$\bar{X}_{20} =$	110.40	95.59	86.81	89.29	97.34
CV(%) =	6.11	8.82	5.59	6.00	3.55
$\bar{X}_G^d =$	110.65	97.04	85.04	87.88	96.00
CV(%) =	7.35	9.79	7.59	8.60	6.03

^a NA = nivel de adición.

^b Símbolos: α -CE (5,6 α -epoxi-5 α -colestán-3 β -ol), 7 β -HC (colest-5-en-3 β ,7 β -diol), CT (5 α -colestán-3 β ,5,6 β -triol), 7-CC (3 β -hidroxicolest-5-en-7-ona) y 25-HC (colest-5-en-3 β ,25-diol).

^c Coeficiente de variación en tanto por ciento.

^d Media global (n = 15).

Tabla 34-Recuperaciones de los diferentes OE a tres niveles de adición para el método 3.

NA ^a	α -CE ^b	7 β -HC	CT	7-CC	25-HC
5	114.42	89.88	60.43	92.63	74.03
5	108.06	71.69	52.40	85.12	72.24
5	99.58	69.62	49.79	74.27	66.35
5	100.64	78.98	57.53	78.44	65.65
5	107.00	91.97	60.85	86.79	71.94
$\bar{X}_5 =$	105.94	80.43	56.20	83.45	70.04
CV(%) ^c =	5.70	12.71	8.76	8.63	5.40
10	115.90	86.49	54.61	87.16	78.02
10	111.53	81.78	53.58	75.27	75.79
10	104.97	70.77	49.97	71.47	73.56
10	103.87	73.91	48.94	87.56	69.10
10	110.43	80.20	50.49	80.02	75.04
$\bar{X}_{10} =$	109.34	78.63	51.52	80.30	74.30
CV(%) =	4.53	8.00	4.74	8.88	4.47
20	110.92	80.04	55.11	84.09	75.81
20	105.38	73.94	51.20	80.24	71.67
20	107.64	74.71	51.92	72.52	67.94
20	110.05	79.28	58.43	78.69	73.91
20	104.23	73.18	53.48	70.21	71.12
$\bar{X}_{20} =$	107.64	76.23	54.03	77.15	72.09
CV(%) =	2.68	4.18	5.34	7.38	4.13
$\bar{X}_G^d =$	107.64	78.43	53.92	80.30	72.14
CV(%) =	4.34	8.76	7.16	8.42	5.00

^a NA = nivel de adición.

^b Símbolos: α -CE (5,6 α -epoxi-5 α -colestan-3 β -ol), 7 β -HC (colest-5-en-3 β ,7 β -diol), CT (5 α -colestan-3 β ,5,6 β -triol), 7-CC (3 β -hidroxicolest-5-en-7-ona) y 25-HC (colest-5-en-3 β ,25-diols).

^c Coeficiente de variación en tanto por ciento.

^d Media global (n = 15).

En estas tres últimas tablas se observa que existen diferencias entre las recuperaciones medias de un mismo OE para un determinado método a los diferentes niveles de adición. Para saber si estas diferencias eran estadísticamente significativas, se aplicó el análisis de la variancia para grupos independientes, para cada OE en cada método, en función del nivel de adición. De la aplicación de este análisis se dedujo que, para todos los OE y con todos los métodos, las diferencias existentes entre las recuperaciones medias a los diferentes niveles de adición no eran estadísticamente significativas. Así, en todos los casos, se consideró una media global de recuperación que agrupaba los resultados de recuperación de un mismo OE, para un mismo método, a los diferentes niveles de adición.

En la tabla 35 se presentan las medias de recuperación de los diferentes OE por niveles de adición y globalmente para cada uno de los tres métodos.

Según los datos de recuperación obtenidos en las diferentes pruebas realizadas con el método 1 (tabla 24 y 32) se puede concluir que muy posiblemente la saponificación en frío no afecta a la estabilidad de α -CE y 7-CC, lo cual, hasta el momento, no está muy claro ya que diferentes autores han demostrado que estos compuestos en caliente y en medio básico se descomponen (apartado II.D.3.1., páginas 107-108). Nuestro resultado está de acuerdo con los trabajos que mantienen que esta descomposición no tiene lugar cuando la saponificación se realiza en frío (Chicoye *et al.*, 1968; Park y Addis, 1986a; Pie *et al.*, 1990); pero está en contraposición con los resultados de recuperación obtenidos, para el 7-CC, por Van de Bovenkamp (1988)

Tabla 35-Recuperaciones medias para los tres métodos de los diferentes OE por niveles de adición y globalmente.

		α -CE ^a	7 β -HC	CT	7-CC	25-HC
M É	$\bar{X}_5^b =$	103.55	88.25	60.99	85.43	81.34
	CV(%) ^c =	11.98	14.64	11.79	12.31	8.94
T O	$\bar{X}_{10}^d =$	99.48	86.37	60.52	83.75	77.25
	CV(%) =	9.15	9.32	7.85	9.68	9.24
D O	$\bar{X}_{20}^e =$	100.61	86.85	61.70	86.50	79.46
	CV(%) =	6.94	5.80	5.17	5.54	5.53
1	$\bar{X}_G^f =$	101.21	87.16	61.07	85.23	79.35
	CV(%) =	9.09	9.88	8.09	8.96	7.79
M É	$\bar{X}_5 =$	111.18	95.08	83.62	86.83	94.86
	CV(%) =	9.81	12.44	10.45	12.09	8.37
T O	$\bar{X}_{10} =$	110.35	97.45	84.70	87.53	95.83
	CV(%) =	7.38	9.87	7.39	8.63	6.46
D O	$\bar{X}_{20} =$	110.40	95.59	86.81	89.29	97.34
	CV(%) =	6.11	8.82	5.59	6.00	3.55
2	$\bar{X}_G =$	110.65	97.04	85.04	87.88	96.00
	CV(%) =	7.35	9.79	7.59	8.60	6.03
M É	$\bar{X}_5 =$	105.94	80.43	56.20	83.45	70.04
	CV(%) =	5.70	12.71	8.76	8.63	5.40
T O	$\bar{X}_{10} =$	109.34	78.63	51.52	80.30	74.30
	CV(%) =	4.53	8.00	4.74	8.88	4.47
D O	$\bar{X}_{20} =$	107.64	76.23	54.03	77.15	72.09
	CV(%) =	2.68	4.18	5.34	7.38	4.13
3	$\bar{X}_G =$	107.64	78.43	53.92	80.30	72.14
	CV(%) =	4.34	8.76	7.16	8.42	5.00

^a Símbolos: α -CE (5,6 α -epoxi-5 α -colestán-3 β -ol), 7 β -HC (colest-5-en-3 β ,7 β -diol), CT (5 α -colestán-3 β ,5,6 β -triol), 7-CC (3 β -hidroxicolest-5-en-7-ona) y 25-HC (colest-5-en-3 β ,25-diols).

^b Media de recuperación para el nivel de adición de 5 μ g (n = 5).

^c Coeficiente de variación en tanto por ciento.

^d Media de recuperación para el nivel de adición de 10 μ g (n = 5).

^e Media de recuperación para el nivel de adición de 20 μ g (n = 5).

^f Media global de recuperación que agrupa los tres niveles de adición (n = 15).

En la tabla 35, como en la ocasión anterior, se puede observar que, de forma general, el método 2 presentó mayores recuperaciones de los OE que el método 1 y este último las presentó mayores que el método 3. Asimismo, también de esta tabla, se deduce que la precisión de las recuperaciones de los diferentes OE para el método 3 fue mayor que para el método 2 y para éste, a su vez, mayor que para el método 1. También a partir de los datos de esta tabla se puede apreciar que el CT tanto para el método 1 como el 3 presentó una recuperación bastante más baja que para el método 2; esto hizo pensar en una pobre recuperación de este OE durante la etapa de saponificación que fue común a los métodos 1 y 3. Continuando con la tabla 35, en ella vemos que la recuperación global del α -CE superó el 100 % para los tres métodos y en el caso de los métodos 2 y 3 lo hizo ampliamente, esto posiblemente es debido a un defecto de integración, favorecido por el solapamiento entre los picos de los derivados silanizados (trimetilsilil éteres) del α -CE y 7β -HC. Este solapamiento seguramente provocó que el integrador sobreestimase el área del pico más pequeño, el del α -CE, e infravalorase la del pico más grande, el del 7β -HC. En relación con este problema, la oportunidad de utilizar un cromatógrafo de gases Perkin Elmer modelo Autosystem conectado a un integrador personal PE Nelson modelo 1020, que permitía un mayor control de la integración que el integrador (HP 3396A) utilizado hasta aquel momento, hizo pensar en la posibilidad de solucionar el problema. Además, con el fin de intentar separar un poco mejor los picos de los trimetilsilil éteres del α -CE y 7β -HC, en este nuevo cromatógrafo se ensayaron varios programas de temperatura de horno, eligiéndose finalmente el que figura en el apartado 2.5.4.

De los resultados de precisión y recuperación obtenidos para estos tres métodos, se concluye que el método más fiable, por presentar una mayor precisión en la determinación y recuperación de los OE, fue el método 3; no obstante, este método presentó todavía una variabilidad moderadamente elevada que no podía considerarse aceptable.

Con el fin de conseguir una mejora en la precisión y recuperación, surgió la idea de plantear un nuevo estudio con los métodos 2 y 3, por ser éstos los más precisos. En esta elección también se tuvo en cuenta que el método 2 era el que presentaba una mayor recuperación para los diferentes OE. También se tuvo en cuenta que en muestras complejas, como el huevo, la purificación con una columna de gel de sílice o en algún caso con cromatografía de exclusión molecular asociada a cromatografía de intercambio iónico es prácticamente

indispensable (Missler *et al.*, 1985; Morgan y Armstrong, 1987, 1989, 1992; Nourooz-Zadeh y Appelqvist, 1987; Tsai y Hudson, 1985; Tsai *et al.*, 1980). La purificación con este tipo de columnas es bastante exhaustiva, con lo cual se puede partir de mayor cantidad de muestra y de esta forma mejorar el límite de detección y cuantificación del método.

Para mejorar la precisión de estos dos métodos se utilizó un PI que se recuperaba a través del cartucho de gel de sílice y que se podía añadir al principio del método. Este PI fue el 19-HC, que se añadió sobre la muestra de huevo en polvo, una vez pesada para el análisis. Con esta modificación se pensó que la dificultad en el control de la velocidad de elución vendría corregida por el PI y la precisión mejoraría sustancialmente (los diferentes eluyentes fueron aplicados al cartucho mediante una jeringa como se describe en el apartado 3.1.4., página 265).

Con esta modificación y utilizando para la determinación cromatográfica el Perkin Elmer modelo Autosystem se procedió a determinar la precisión y recuperación para los métodos 2 y 3.

Los resultados de las 10 determinaciones que se realizaron con cada uno de estos dos métodos, para establecer su precisión, figuran en las tablas 36 y 37. Para el cálculo de estos resultados se tuvo en cuenta la recuperación del PI (19-HC) en cada uno de estos dos métodos, que fue del 80.96 % para el método 2 y del 72.98 % para el 3. La recuperación del 19-HC en estos dos métodos fue determinada utilizando, a su vez, el 5 α -colestano como PI.

En la tabla 38 figuran únicamente los valores medios y CV de estas determinaciones para estos dos métodos.

Tabla 36-Precisión del método 2 (ppm).

Repetición	α -CE ^a	7 β -HC	CT	7-CC	25-HC
1	9.70	81.84	13.38	26.44	2.03
2	9.16	79.80	12.79	25.45	1.79
3	9.48	81.98	13.27	26.38	1.88
4	9.06	78.49	12.69	24.76	1.57
5	8.96	74.26	11.90	24.00	1.75
6	10.34	85.80	14.26	27.38	2.03
7	8.88	78.50	12.37	25.03	1.75
8	10.05	88.82	14.25	27.62	1.93
9	9.62	81.93	13.26	26.63	2.10
10	9.17	79.47	12.70	25.01	1.55
\bar{X} =	9.44	81.09	13.09	25.87	1.84
CV(%) ^b =	5.14	5.01	5.81	4.62	10.47

^a Símbolos: α -CE (5,6 α -epoxi-5 α -colestán-3 β -ol), 7 β -HC (colest-5-en-3 β ,7 β -diol), CT (5 α -colestán-3 β ,5,6 β -triol), 7-CC (3 β -hidroxicolest-5-en-7-ona) y 25-HC (colest-5-en-3 β ,25-diols).

^b Coeficiente de variación en tanto por ciento.

Tabla 37- Precisión del método 3 (ppm).

Repetición	α -CE ^a	7 β -HC	CT	7-CC	25-HC
1	8.94	80.54	13.35	21.46	1.69
2	9.73	86.86	14.22	23.15	1.82
3	9.49	84.06	14.31	22.83	1.76
4	9.12	81.54	13.71	21.44	1.56
5	9.77	83.97	14.45	22.66	1.79
6	9.08	81.87	13.81	21.82	1.72
7	9.49	84.12	14.29	22.61	1.78
8	9.13	80.53	13.70	21.22	1.56
9	8.84	80.38	13.53	21.60	1.66
10	9.84	90.10	15.17	23.43	1.88
\bar{X} =	9.34	83.40	14.05	22.22	1.72
CV(%) ^b =	3.92	3.78	3.85	3.60	6.20

^a Símbolos: α -CE (5,6 α -epoxi-5 α -colestán-3 β -ol), 7 β -HC (colest-5-en-3 β ,7 β -diol), CT (5 α -colestán-3 β ,5,6 β -triol), 7-CC (3 β -hidroxicolest-5-en-7-ona) y 25-HC (colest-5-en-3 β ,25-diols).

^b Coeficiente de variación en tanto por ciento.

Tabla 38-Precisión de los métodos 2 y 3 (ppm).

	α -CE ^a	7 β -HC	CT	7-CC	25-HC
$\bar{X}_2^b =$	9.44	81.09	13.09	25.87	1.84
CV(%) ^c =	5.14	5.01	5.81	4.62	10.47
$\bar{X}_3^d =$	9.34	83.40	14.05	22.22	1.72
CV(%) =	3.92	3.78	3.85	3.60	6.20

^a Símbolos: α -CE (5,6 α -epoxi-5 α -colestán-3 β -ol), 7 β -HC (colest-5-en-3 β ,7 β -diol), CT (5 α -colestán-3 β ,5,6 β -triol), 7-CC (3 β -hidroxicolest-5-en-7-ona) y 25-HC (colest-5-en-3 β ,25-diols).

^b Media para el método 2 (n = 10).

^c Coeficiente de variación en tanto por ciento.

^d Media para el método 3 (n = 10).

De los resultados de la tabla 38 se deduce que el método 3 fue más preciso que el 2.

Los resultados de recuperación a los tres niveles de adición de los 5 OE para los métodos 2 y 3 figuran en las tablas 39 y 40, respectivamente.

Tabla 39-Recuperaciones de los diferentes OE a tres niveles de adición para el método 2.

NA ^a	α -CE ^b	7 β -HC	CT	7-CC	25-HC
5	96.15	88.27	88.38	88.58	96.75
5	103.66	99.52	96.21	95.56	103.19
5	105.08	110.23	93.96	92.40	106.78
5	88.85	76.32	82.82	74.41	88.59
5	99.47	105.04	101.18	105.10	106.47
$\bar{X}_5 =$	98.64	95.87	92.51	91.21	100.36
CV(%) ^c =	6.60	14.22	7.68	12.29	7.69
10	96.55	92.23	91.40	84.29	96.34
10	100.89	97.14	94.59	93.52	101.22
10	96.99	85.40	86.14	86.73	91.70
10	93.99	92.09	89.53	87.28	94.31
10	108.15	104.95	97.07	100.08	106.75
$\bar{X}_{10} =$	99.32	94.36	91.75	90.50	98.06
CV(%) =	5.56	7.68	4.65	6.92	6.10
20	97.42	90.65	91.40	91.26	96.34
20	100.91	98.08	95.50	93.32	101.22
20	92.60	94.05	91.42	90.44	97.32
20	93.98	92.09	89.53	90.07	95.34
20	101.93	101.74	97.21	97.61	99.76
$\bar{X}_{20} =$	97.37	95.32	93.01	92.54	98.00
CV(%) =	4.22	4.77	3.45	3.36	2.49
$\bar{X}_G^d =$	98.44	95.19	92.42	91.42	98.81
CV(%) =	5.21	9.06	5.17	7.78	5.56

^a NA = nivel de adición.

^b Símbolos: α -CE (5,6 α -epoxi-5 α -colestán-3 β -ol), 7 β -HC (colest-5-en-3 β ,7 β -diol), CT (5 α -colestán-3 β ,5,6 β -triol), 7-CC (3 β -hidroxicolest-5-en-7-ona) y 25-HC (colest-5-en-3 β ,25-diol).

^c Coeficiente de variación en tanto por ciento.

^d Media global (n = 15).

Tabla 40-Recuperaciones de los diferentes OE a tres niveles de adición para el método 3.

NA ^a	α -CE ^b	7 β -HC	CT	7-CC	25-HC
5	94.00	92.08	90.23	87.97	97.41
5	101.34	103.81	98.22	98.17	102.00
5	101.67	109.85	95.93	94.93	102.18
5	86.78	86.33	84.55	83.70	87.57
5	97.25	109.57	97.43	102.92	101.10
$\bar{X}_5 =$	96.21	100.33	93.27	93.54	98.05
CV(%) ^c =	6.39	10.60	6.21	8.27	6.29
10	94.39	96.21	93.31	87.22	95.23
10	98.64	101.33	96.56	96.08	100.05
10	94.82	96.26	91.16	93.41	90.64
10	91.89	96.06	91.40	89.67	93.22
10	102.47	109.48	102.69	101.36	107.19
$\bar{X}_{10} =$	96.44	99.87	95.02	93.55	97.26
CV(%) =	4.30	5.83	5.05	5.92	6.72
20	95.24	94.56	93.31	93.76	95.23
20	98.65	102.31	97.50	94.09	100.05
20	95.64	98.11	93.33	92.91	96.20
20	90.97	96.06	93.40	93.75	96.30
20	99.65	103.00	99.24	100.28	98.61
$\bar{X}_{20} =$	96.03	98.81	95.36	94.96	97.28
CV(%) =	3.55	3.79	2.96	3.17	2.04
$\bar{X}_G^d =$	96.23	99.67	94.55	94.01	97.53
CV(%) =	4.54	6.84	4.65	5.72	5.06

^a NA = nivel de adición.

^b Símbolos: α -CE (5,6 α -epoxi-5 α -colestán-3 β -ol), 7 β -HC (colest-5-en-3 β ,7 β -diol), CT (5 α -colestán-3 β ,5,6 β -triol), 7-CC (3 β -hidroxicolest-5-en-7-ona) y 25-HC (colest-5-en-3 β ,25-diols).

^c Coeficiente de variación en tanto por ciento.

^d Media global (n = 15).

En estas dos últimas tablas se observa que existen diferencias entre las recuperaciones medias de un mismo OE para un determinado método a los diferentes niveles de adición. Para saber si estas diferencias eran estadísticamente significativas, se aplicó el análisis de la variancia para grupos independientes, para cada OE en cada método, en función del nivel de adición. De la aplicación de este análisis se dedujo que para todos los OE en todos los métodos las diferencias existentes entre las recuperaciones medias a los diferentes niveles de adición no eran estadísticamente significativas, así en todos los casos se consideró una media global de recuperación, que agrupaba los resultados de recuperación de un mismo OE para un mismo método a los diferentes niveles de adición.

En la tabla 41 se presentan las medias de recuperación de los diferentes OE por niveles de adición y globalmente para cada uno de los dos métodos.

Tabla 41-Recuperaciones medias para los métodos 2 y 3 de los diferentes OE por niveles de adición y globalmente.

		α -CE ^a	7 β -HC	CT	7-CC	25-HC
M	$\bar{X}_5^b =$	98.64	95.87	92.51	91.21	100.36
É	CV(%) ^c =	6.60	14.22	7.68	12.29	7.69
T	$\bar{X}_{10}^d =$	99.32	94.36	91.75	90.50	98.06
O	CV(%) =	5.56	7.68	4.65	6.92	6.10
D	$\bar{X}_{20}^e =$	97.37	95.32	93.01	92.54	98.00
O	CV(%) =	4.22	4.77	3.45	3.36	2.49
	$\bar{X}_G^f =$	98.44	95.19	92.42	91.42	98.81
2	CV(%) =	5.21	9.06	5.17	7.78	5.56
M	$\bar{X}_5 =$	96.21	100.33	93.27	93.54	98.05
É	CV(%) =	6.39	10.60	6.21	8.27	6.29
T	$\bar{X}_{10} =$	96.44	99.87	95.02	93.55	97.26
O	CV(%) =	4.30	5.83	5.05	5.92	6.72
D	$\bar{X}_{20} =$	96.03	98.81	95.36	94.96	97.28
O	CV(%) =	3.55	3.79	2.96	3.17	2.04
	$\bar{X}_G =$	96.23	99.67	94.55	94.01	97.53
3	CV(%) =	4.54	6.84	4.65	5.72	5.06

^a Símbolos: α -CE (5,6 α -epoxi-5 α -colestán-3 β -ol), 7 β -HC (colest-5-en-3 β ,7 β -diol), CT (5 α -colestán-3 β ,5,6 β -triol), 7-CC (3 β -hidroxicolest-5-en-7-ona) y 25-HC (colest-5-en-3 β ,25-diol).

^b Media de recuperación para el nivel de adición de 5 μ g (n = 5).

^c Coeficiente de variación en tanto por ciento.

^d Media de recuperación para el nivel de adición de 10 μ g (n = 5).

^e Media de recuperación para el nivel de adición de 20 μ g (n = 5).

^f Media global de recuperación que agrupa los tres niveles de adición (n = 15).

En la tabla 41, se puede observar que la precisión de las recuperaciones de los diferentes OE fue mayor para el método 3 que para el método 2. En esta misma tabla, a diferencia de en los estudios de recuperación realizados anteriormente, se observa que las recuperaciones globales de los 5 OE, para ambos métodos, superaron el 90 %. Entre estos dos métodos existieron diferencias en sus valores de recuperación global para los diferentes OE, siendo mayores estos valores en el método 3 para el 7 β -HC, CT, 7-CC y 25-HC; y en el método 2 para el α -CE. Para saber si estas diferencias existentes eran estadísticamente significativas, se aplicó la prueba de la t de Student-Fisher para datos independientes, resultando para todos

los OE que las diferencias no eran estadísticamente significativas. En función de esto se eligió como método más fiable para la determinación de OE el método 3, por presentar una mayor precisión que el método 2 y unos valores de recuperación de los 5 OE que no diferían estadísticamente de los del método 2.

3.2.3. LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN CROMATOGRÁFICA DE LOS DIFERENTES OXIESTEROLES.

Según la tendencia actual, estos límites caracterizan tan sólo la determinación cromatográfica, pues, sólo tienen en cuenta la variabilidad introducida por esta fase y no la introducida por la totalidad de las etapas que configuran el método analítico. Esto es debido a la dificultad que supone obtener blancos para el método analítico completo, ya que la obtención de una muestra idéntica a la que se analiza, pero con la seguridad de que en ella no estén presentes el compuesto o compuestos que se determinan, es prácticamente imposible. Este problema da lugar a que el cálculo de estos límites para el método completo sea un tema cada vez más controvertido, lo cual resta importancia a estos límites, de cara a la caracterización métodos destinados al análisis de trazas. Por otro lado, la constatación de estos límites en las publicaciones es cada vez menos frecuente y cuando aparecen, generalmente, hacen referencia únicamente al método cromatográfico. A esta menor utilización de dichos parámetros contribuye también la multitud de sistemas de cálculo existentes para ellos, que generan resultados finales muy dispares partiendo de un mismo caso práctico (Bonate, 1990; Winefordner y Long, 1983).

De entre las múltiples definiciones que se han dado para el límite de detección (LD), podemos destacar por su concreción, aquella según la cual este límite viene determinado por la mínima cantidad o concentración de una sustancia que puede detectarse de forma certera con una probabilidad elegida (Gabriels, 1970). Otra definición interesante de LD, por ajustarse al procedimiento de cálculo que se siguió en nuestro estudio para este parámetro, es la que dio Knoll en 1985, según la cual se puede definir el LD como la concentración de analito que da lugar a un pico cromatográfico con una altura igual a 3 veces la desviación estándar del ruido de fondo, estimándose este último valor a partir de la altura de la mayor fluctuación de la línea de base en un intervalo preseleccionado del cromatograma de un blanco.

En nuestro estudio, el cálculo del LD y del límite de cuantificación (LC) se realizó según el procedimiento propuesto por Knoll (1985) que se basa en las fórmulas siguientes:

$$C_{LD} = K_{LD} \cdot h_n \cdot C_p/h_p$$

$$C_{LC} = K_{LC} \cdot h_n \cdot C_p/h_p$$

C_{LD} y C_{LC} corresponden respectivamente al LD y LC expresados en las unidades en que se exprese C_p .

K_{LD} y K_{LC} son respectivamente las constantes utilizadas para el cálculo del LD y LC, el valor de estas constantes depende de la amplitud del intervalo preseleccionado de cromatograma en donde se mide h_n .

h_n es la altura de la mayor fluctuación de la línea de base, tanto en sentido positivo como negativo, en un intervalo preseleccionado del cromatograma de un blanco.

C_p/h_p es la relación entre la concentración de una solución de patrón y la altura del pico cromatográfico a que da lugar al ser inyectada.

La selección para un determinado compuesto del intervalo de cromatograma en donde se medirá h_n se realiza a partir de la anchura de su pico a media altura (AP), un múltiplo de esta anchura nos da la amplitud de este intervalo (AI) que se centra en el TR del pico. Según se multiplique AP por un valor o por otro, varían K_{LD} y K_{LC} . En la tabla 42 se muestran los valores de estas constantes en función del múltiplo de AP (n) que se utilice.

Tabla 42-Valores de K_{LC} y K_{LD} según el múltiplo de AP utilizado.

Múltiplo de la anchura de pico a media altura	K_{LC}	K_{LD}
10	1.9718	5.755
20	1.4309	4.150
50	0.9194	2.656
100	0.6536	1.885

La figura 14 muestra como se mide h_n en el intervalo seleccionado.

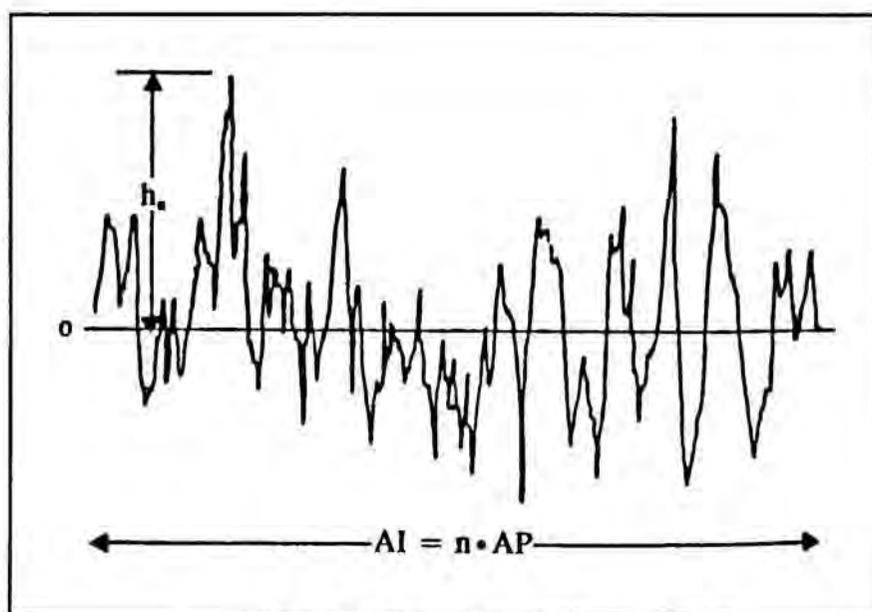


Figura 14-Medición de h_n en el intervalo de cromatograma seleccionado.

Para que se pueda utilizar este procedimiento de cálculo es necesario que se cumplan tres condiciones:

1) la variabilidad introducida por el proceso de calibración es pequeña comparada con la que introduce el ruido de fondo, esto es así cuando se utiliza un patrón interno con elevada pureza;

2) la anchura a media altura, del pico correspondiente al compuesto del que se quieren determinar estos límites, es independiente de su magnitud;

3) C_p/h_p es independiente de C_p y por lo tanto el valor de los límites obtenidos no depende de la concentración de la solución patrón utilizada para calcular esta relación. Esto implica trabajar en el rango lineal del detector para la realización de este cálculo.

La segunda de estas condiciones se comprobó para cada OE comparando, mediante el análisis de la variancia para grupos independientes, las medias de AP obtenidas a diferentes concentraciones de patrón. En todos los casos el resultado de este análisis no fue estadísticamente significativo, con lo cual no se pudo concluir que existía dependencia entre AP y la magnitud del pico de ninguno de los cinco OE.

En nuestro estudio se trabajó con dos cromatógrafos, empleando condiciones cromatográficas distintas, lo cual hizo necesario calcular el LD y LC para los dos casos. En cada caso este cálculo se realizó según se describe, el valor medio del TR, AP y C_p/h_p para cada OE se obtuvo a partir de su recta de calibrado. Estos valores medios con su coeficiente de variación, para cada OE en cada cromatógrafo, figuran en la tabla 43.

Tabla 43-Valor medio y coeficiente de variación del TR, AP y C_p/h_p para cada OE en cada cromatógrafo.

Cromatógrafo	Parámetro	α -CE ^a	7 β -HC	CT	7-CC	25-HC
Sigma 2000	TR ^b \bar{X} =	18.37	18.23	20.39	20.90	21.39
	CV(%) ^c =	0.17	0.17	0.19	0.17	0.17
	AP ^d \bar{X} =	0.07	0.08	0.11	0.12	0.10
	CV(%) =	6.14	4.72	6.71	4.91	4.12
	C_p/h_p ^e \bar{X} =	5.81	4.46	5.54	7.54	5.43
	CV(%) =	4.69	5.71	7.95	6.73	6.23
Autosystem	TR \bar{X} =	26.46	26.60	29.32	29.73	30.41
	CV(%) =	0.14	0.12	0.11	0.17	0.11
	AP \bar{X} =	0.10	0.10	0.08	0.08	0.07
	CV(%) =	1.11	2.13	5.22	4.33	3.04
	C_p/h_p ^f \bar{X} =	4.79	3.91	4.00	3.74	3.11
	CV(%) =	7.80	7.65	6.03	5.70	6.12

^a Símbolos: α -CE (5,6 α -epoxi-5 α -colestán-3 β -ol), 7 β -HC (colest-5-en-3 β ,7 β -diol), CT (5 α -colestán-3 β ,5,6 β -triol), 7-CC (3 β -hidroxicolest-5-en-7-ona) y 25-HC (colest-5-en-3 β ,25-diol).

^b Tiempo de retención en minutos.

^c Coeficiente de variación en tanto por ciento.

^d Anchura de pico a media altura en minutos.

^e C_p = concentración de patrón en ppm y h_p = altura de pico en cm.

^f C_p = concentración de patrón en ppm y h_p = altura de pico en mV.

La baja variabilidad presentada por los TR de los diferentes OE, en ambos cromatógrafos, nos llevó a elegir el valor 10 como múltiplo de AP, para determinar la amplitud del intervalo en donde se midió h_n . Una vez determinada esta amplitud se procedió a inyectar, en cada cromatógrafo, 10 blancos constituidos por 50 μ l de piridina + 50 μ l de reactivo silanizante. En estos 10 blancos se midió h_n y se hizo la media. Los resultados medios de h_n con sus coeficientes de variación para cada OE en cada cromatógrafo figuran en la tabla 44. La figura 15 ejemplifica la medición de h_n en el intervalo preseleccionado de cromatograma. En esta figura se muestran el cromatograma de un blanco obtenido con el cromatógrafo Perkin Elmer Autosystem y su línea de base ampliada, sobre esta línea de base se marcan los

intervalos para el α -CE, CT y 25-HC y se señalan las fluctuaciones que dieron lugar a los valores de h_n para estos dos OE.

Tabla 44-Resultados medios y coeficientes de variación de h_n para cada OE en cada cromatógrafo ($n = 10$).

Cromatógrafo	Parámetro	α -CE ^a	7 β -HC	CT	7-CC	25-HC
Sigma 2000	$h_n^b \quad \bar{X} =$	0.20	0.19	0.21	0.20	0.20
	CV(%) ^c =	15.71	19.37	13.05	18.87	11.85
Autosystem	$h_n^d \quad \bar{X} =$	0.19	0.21	0.18	0.18	0.19
	CV(%) =	56.63	61.09	68.54	71.93	80.92

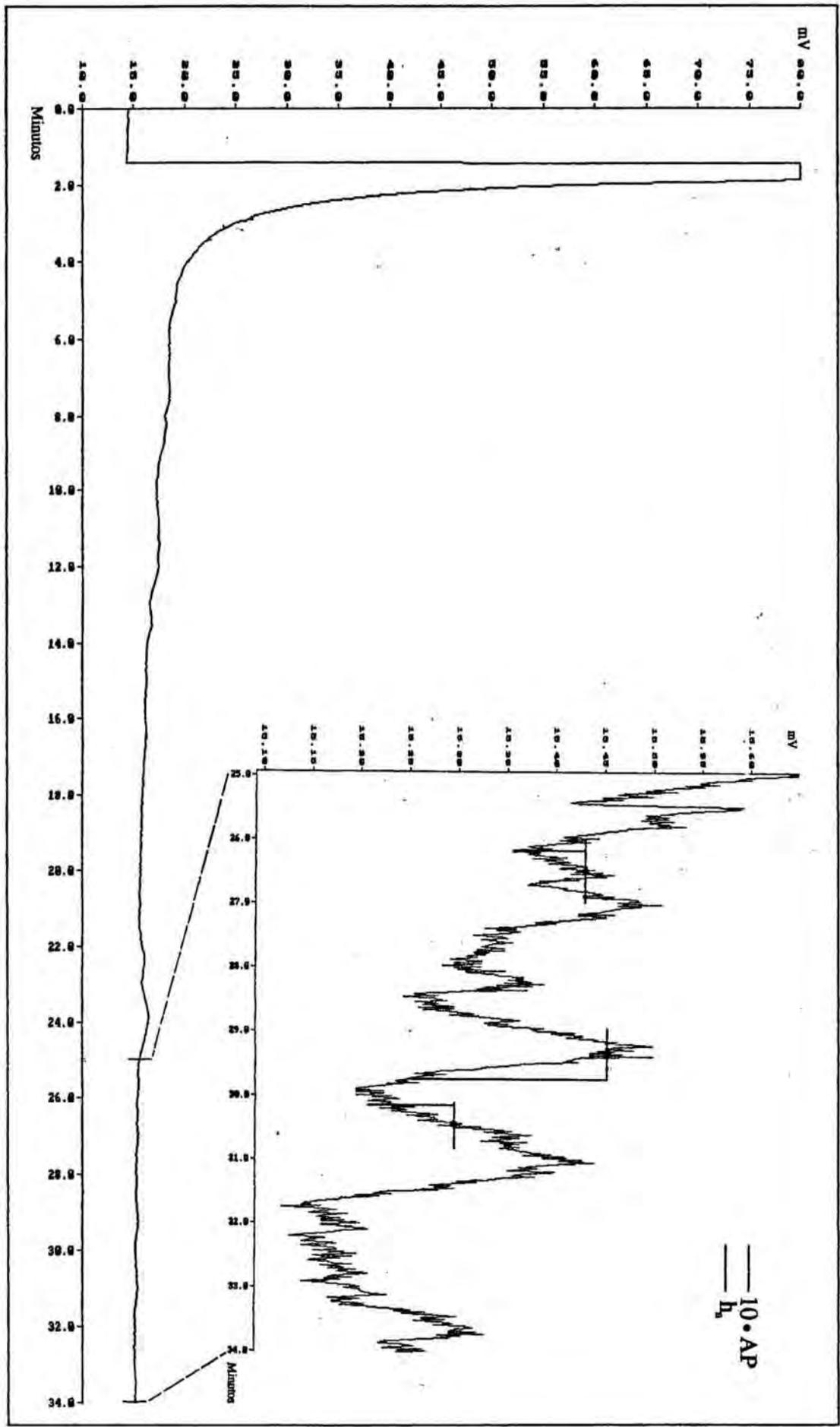
^a Símbolos: α -CE (5,6 α -epoxi-5 α -colestán-3 β -ol), 7 β -HC (colest-5-en-3 β ,7 β -diol), CT (5 α -colestán-3 β ,5,6 β -triol), 7-CC (3 β -hidroxicolest-5-en-7-ona) y 25-HC (colest-5-en-3 β ,25-diols).

^b Altura en cm de la fluctuación más amplia en un intervalo preseleccionado de cromatograma.

^c Coeficiente de variación en tanto por ciento.

^d Altura en mV de la fluctuación más amplia en un intervalo preseleccionado de cromatograma.

Figura 15-Medición de h_u en un intervalo preseleccionado de un cromatograma correspondiente a un blanco obtenido con el cromatógrafo Perkin Elmer Autosystem.



Los diferentes valores obtenidos se aplicaron en las fórmulas del LD y LC, utilizando las constantes $K_{LD} = 1.9718$ y $K_{LC} = 5.755$, con lo que se obtuvieron los valores de estos dos parámetros en ppm sobre la solución final inyectada para cada OE (tabla 45).

Tabla 45-LD y LC para los diferentes OE en cada cromatógrafo (ppm sobre la muestra final inyectada).

Cromatógrafo	parámetro	α -CE ^a	7 β -HC	CT	7-CC	25-HC
Sigma 2000	LD	1.65	2.34	2.28	2.94	2.16
	LC	4.80	6.82	6.66	8.59	6.31
Autosystem	LD	1.78	1.61	1.40	1.47	1.16
	LC	5.18	4.68	4.09	4.30	3.38

^a Símbolos: α -CE (5,6 α -epoxi-5 α -colestán-3 β -ol), 7 β -HC (colest-5-en-3 β ,7 β -diol), CT (5 α -colestán-3 β ,5,6 β -triol), 7-CC (3 β -hidroxicolest-5-en-7-ona) y 25-HC (colest-5-en-3 β ,25-diols).

Además de calcular estos límites utilizando el intervalo 10 x AP, también se calcularon con el intervalo 50 x AP, los resultados obtenidos difirieron en función del cromatógrafo, pues, mientras que en el Sigma 2000, cuando se trabajaba con 50 x AP, el valor de estos límites disminuía ligeramente, respecto a cuando se hacía con 10 x AP, en el Autosystem este valor aumentaba. Esta diferenciación se explica por el hecho de que en el primer cromatógrafo el ruido de fondo se distribuyó más uniformemente a lo largo de la línea de base del cromatograma, lo cual se reflejó en la variabilidad de h_n , que fue más alta en el Sigma 2000 que en el Autosystem (tabla 44).

Por otro lado, también se calcularon estos límites con las fórmulas:

$$C_{LD} = K_{LD} \cdot h_n/h_{pi} \cdot \frac{C_p}{h_p/h_{pi}}$$

$$C_{LC} = K_{LC} \cdot h_n/h_{pi} \cdot \frac{C_p}{h_p/h_{pi}}$$

En donde,

h_{pi} es la altura del pico de patrón interno.

Los resultados obtenidos con estas fórmulas fueron casi idénticos a los obtenidos con las fórmulas anteriores, esto es debido a que el PI prácticamente no introdujo variabilidad. La única diferencia en el procedimiento de cálculo utilizado al trabajar con estas fórmulas es que el blanco utilizado además de los 50 μ l de piridina + 50 μ l de reactivo silanizante contuvo 25 μ g de PI (19-HC). A partir de este blanco se calculó la relación h_n/h_{pi} para cada OE. La otra relación en la que interviene h_{pi} se calculó, para cada OE, a partir de su recta de calibrado.

No obstante, aunque estos límites presentan una gran importancia en la caracterización de métodos analíticos, a nivel práctico poseen mayor interés los límites referidos a todo el método. Sin embargo, a partir de los límites referidos al método cromatográfico se puede obtener una aproximación bastante válida de los límites referidos a todo el método analítico. Esta aproximación consiste sencillamente, en referir estos límites cromatográficos al peso de muestra de partida. En nuestro caso, como se silaniza todo el extracto procedente de la muestra y se parte de 0.65g de huevo en polvo (aprox. 0.65g de materia seca, pues, la humedad del huevo en polvo es muy baja), es tan sencillo como dividir los resultados de la tabla 46 por 6.5 (tabla 46). Esto es así, ya que por ejemplo, el LD del α -CE es 1.65 ppm sobre muestra final inyectada (volumen muestra final 100 μ l), por tanto el LD son 0.165 μ g/100 μ l, como estos 100 μ l cuando se analiza huevo en polvo contienen todos los OE extraídos de este huevo podemos decir que el LD referido al peso de muestra de partida sería $0.165 \mu\text{g}/0.65 = 1.65/6.5\text{g}$.

Tabla 46-Aproximaciones del LD y LC referidos a todo el método analítico para los diferentes OE (ppm sobre muestra seca, caso del huevo en polvo).

Cromatógrafo	parámetro	α -CE ^a	7 β -HC	CT	7-CC	25-HC
Sigma 2000	LD	0.25	0.36	0.35	0.45	0.33
	LC	0.74	1.05	1.03	1.32	0.97
Autosystem	LD	0.27	0.25	0.22	0.23	0.18
	LC	0.80	0.72	0.63	0.66	0.52

* Símbolos: α -CE (5,6 α -epoxi-5 α -colestan-3 β -ol), 7 β -HC (colest-5-en-3 β ,7 β -diol), CT (5 α -colestan-3 β ,5,6 β -triol), 7-CC (3 β -hidroxicolest-5-en-7-ona) y 25-HC (colest-5-en-3 β ,25-diol).

Estos límites dependen claramente de la cantidad de muestra utilizada por tanto en los casos del huevo congelado y fresco en los que se parte de 4 y 5g (0.96 y 1.2 materia seca), respectivamente, tenemos que estos límites son inferiores. Además, con este método la purificación es muy exhaustiva, lo cual en el caso de muestras con pequeñas o nulas cantidades de OE, posibilita partir de elevadas cantidades de muestra, con lo cual LC y LD disminuyen notablemente. Esto se ha hecho así cuando se han analizado con este método muestras de leches maternizadas, caso en el que se partieron de 1.3 g.

4. BIBLIOGRAFÍA.

Addis, P.B., Emanuel, H.A., Bergmann, S.D. y Zavoral, J.H. (1989). Capillary GC quantification of cholesterol oxidation products in plasma lipoproteins of fasted humans. *Free Radical Biol. Med.* **7**, 179-182.

Bonate, P.L. (1990). Chromatographic calibration revisited. *J. Chromatogr. Sci.* **28**, 559-562.

Csallany, A. S., Kindom, S. E., Addis, P. B. y Lee, J-H. (1989). HPLC method for quantitation of cholesterol and four of its major oxidation products in muscle and liver tissues. *Lipids* **24**, 645-651.

Csiky, I. (1982). Trace enrichment and separation of cholesterol oxidation products by absorption high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **24**, 381-389.

Chicoye, E., Powrie, W.D. y Fennema, O. (1968). Photooxidation of cholesterol in spray-dried egg yolk upon irradiation. *J. Food Sci.* **3**, 581-587.

De Vore, V.R. (1988). TBA values and 7-ketocholesterol in refrigerated raw and cooked ground beef. *J. Food Sci.* **53**, 1058-1061.

Dumazer, M., Farines, M. y Soulier, J. (1986). Identification de stérols par spectrométrie de masse. *Rev. Fr. Corps Gras* **33**, 151-156.

Emanuel, H.A., Hassel, C.A., Addis, P.B., Bergmann, S.D. y Zavoral, J.H. (1991). Plasma cholesterol oxidation products (oxysterols) in human subjects fed a meal rich in oxysterols. *J. Food Sci.* **56**, 843-847.

Fillion, L., Zee, J.A. y Gosselin, C. (1991). Determination of a cholesterol oxide mixture by a single-run high-performance liquid chromatographic analysis using benzylation. *J. Chromatogr.* **547**, 105-112.

Folch, J., Lees, M. y Sloane Stanley, G.H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **226**, 497-509.

Fontana, A., Antoniazzi, F., Cimino, G., Mazza, G., Trivellone, E. y Zanone, B. (1992). High resolution NMR detection of cholesterol oxides in spray-dried egg yolk. *J. Food Sci.* **57**, 869-879.

Gabriels, R. (1970). A general method for calculating the detection limit in chemical analysis. *Anal. Chem.* **42**, 1439-1440.

Hwang, K.T. y Maerker, G. (1993). Quantitation of cholesterol oxidation products in unirradiated and irradiated meats. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **70**, 371-375.

Knoll, J.E. (1985). Estimation of the limit of detection in chromatography. *J. Chromatogr. Sci.* **23**, 422-425.

Linden, G. (1978). Le contrôle de qualité des analyses en chimie alimentaire: Considérations générales et perspectives. *Ind. Aliment. Agric.* 1247-1253.

Maerker, G. y Jones, K.C. (1992). Gamma-irradiation of individual cholesterol oxidation products. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **69**, 451-455.

Missler, S.R., Wasilchuk, B.A. y Merritt, C. (1985). Separation and identification of cholesterol oxidation products in dried egg preparations. *J. Food Sci.* **50**, 595-598, 646.

Morgan, J.N. y Armstrong, D.J. (1987). Formation of cholesterol-5,6-epoxides during Spray-drying of egg yolk. *J. Food Sci.* **52**, 1224-1227.

Morgan, J.N. y Armstrong, D.J. (1989). Wide-bore capillary gas chromatographic method for quantification of cholesterol oxidation products in egg yolk powder. *J. Food Sci.* **54**, 427-429, 457.

- Morgan, J.N. y Armstrong, D.J. (1992). Quantification of cholesterol oxidation products in egg yolk powder spray-dried with direct heating. *J. Food Sci.* **57**, 43-45, 107.
- Nawar, W.W., Kim, S.K., Li, Y.J. y Vadjji, M. (1991). Measurement of oxidative interactions of cholesterol. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **68**, 496-498.
- Nourooz-Zadeh, J. y Appelqvist, L-Å. (1987). Cholesterol oxides in swedish foods and food ingredients: Fresh eggs and dehydrated egg products. *J. Food Sci.* **52**, 57-62, 67.
- Nourooz-Zadeh, J. y Appelqvist, L-Å. (1988a). Cholesterol oxides in swedish foods and food ingredients: Butter and cheese. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **65**, 1635-1641.
- Nourooz-Zadeh, J. y Appelqvist, L-Å. (1988b). Cholesterol oxides in swedish foods and food ingredients: Milk powder products. *J. Food Sci.* **53**, 74-79, 87.
- Nourooz-Zadeh, J. y Appelqvist, L-Å. (1989). Cholesterol oxides in swedish foods and food ingredients: Lard and bacon. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **66**, 586-592.
- Park, S.W. y Addis, P.B. (1985a). Capillary column gas-liquid chromatographic resolution of oxidized cholesterol derivatives. *Anal. Biochem.* **149**, 275-283.
- Park, S.W. y Addis, P.B. (1985b). HPLC determination of C-7 oxidized Cholesterol derivatives in foods. *J. Food Sci.* **50**, 1437-1441, 1444.
- Park, S.W. y Addis, P.B. (1986a). Identification and quantitative estimation of oxidized cholesterol derivatives in heated tallow. *J. Agric. Food Chem.* **34**, 653-659.
- Park, S.W. y Addis, P.B. (1986b). Further investigation of oxidized cholesterol derivatives in heated fats. *J. Food Sci.* **51**, 1380-1381.
- Park, S.W. y Addis, P.B. (1987). Cholesterol oxidation products in some muscle foods. *J. Food Sci.* **52**, 1500-1503.
- Park, S.W. y Addis, P.B. (1992). Methods of analysis of cholesterol oxides. En *Biological effects of cholesterol oxides* (S.K. Peng y R.J. Morin, Ed.). p.33-70. CRC Press, Boca Raton-Ann Arbor-Londres.
- Pie, J.E. y Seillan, C. (1992). Oxysterols in cultured bovine aortic smooth muscle cells and in the monocyte-like cell line. *Lipids* **27**, 270-274.
- Pie, J.E., Spahis, K. y Seillan, C. (1990). Evaluation of oxidative degradation of cholesterol in food and food ingredients: Identification and quantification of cholesterol oxides. *J. Agric. Food Chem.* **38**, 973-979.
- Sander, B.D., Smith, D.E. y Addis, P.B. (1988). Effectes of processing stage and storage conditions on cholesterol oxidation products in butter and cheddar cheese. *J. Dairy Sci.* **71**, 3173-3178.

- Sander, B.D., Smith, D.E., Addis, P.B. y Park, S.W. (1989). Effects of prolonged and adverse storage conditions on levels of cholesterol oxidation products in dairy products. *J. Food Sci.* **54**, 874-879.
- Scherz, H. y Senser, F. (1989). Souci, Fachmann and Kraut *Food composition and nutrition tables 1989/90*. p. 124-126. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft GmbH, Stuttgart, Alemania.
- Tsai, L.S. y Hudson, C.A. (1985). Cholesterol oxides in commercial dry egg products: Quantitation. *J. Food Sci.* **50**, 229-231, 237.
- Tsai, L.S., Ijichi, K., Hudson, C.A. y Meehan, J.J. (1980). A method for the quantitative estimation of cholesterol α -oxide in eggs. *Lipids* **15**, 124-128.
- Van de Bovenkamp, P., Kosmeijer-schuil, T.G. y Katan, M.B. (1988). Quantification of oxysterols in dutch foods: Egg products and mixed diets. *Lipids* **23**, 1079-1085.
- Williams, L.D. y Pearson, A.H. (1966). Unsaponifiable fraction of pork fat as related to boar odor. *J. Agric. Food Chem.* **13**, 573-577.
- Winefordner, J.D. y Long, G.L. (1983). Limit of detection: A closer look at the IUPAC definition. *Anal. Chem.* **55**, 712-724A
- Yan, P.S. y White, P.J. (1990). Cholesterol oxidation in heated lard enriched with two levels of cholesterol. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **67**, 927-931.
- Zhang, W.B. y Addis, P.B. (1990). Prediction of levels of cholesterol oxides in heated tallow by dielectric measurement. *J. Food Sci.* **55**, 1673-1675.
- Zhang, W.B., Addis, P.B. y Krick, T.P. (1991). Quantification of 5 α -cholestane-3 β ,5,6 β -triol and other cholesterol oxidation products in fast food french fried potatoes. *J. Food Sci.* **56**, 716-718.
- Zubillaga, M.P. y Maerker, G. (1991). Quantification of three cholesterol oxidation products in raw meat and chicken. *J. Food Sci.* **56**, 1194-1202.

**IV.C. CONTENIDOS DE OXIESTEROLES EN HUEVO FRESCO
Y OVOPRODUCTOS.**

1. Contenidos de oxистерoles en huevo fresco y liofilizado.	331
2. Contenidos de oxистерoles en ovoproductos comerciales.	334
3. Bibliografía.	337

1. CONTENIDO DE OXIESTEROLES EN HUEVO FRESCO Y LIOFILIZADO.

El contenido de oxистерoles en huevo fresco ha sido estudiado por diversos autores. Entre ellos, Pennock *et al.* (1962) detectaron colest-3,5-dien-7-ona en este alimento. No obstante, esta determinación se realizó con un método del que formaba parte la saponificación en caliente, por lo cual, posiblemente, este compuesto fue un artefacto (apartado II.D.3.1., páginas 107-108). Sin embargo, en otros trabajos donde no se utilizó la saponificación en caliente se detectaron niveles muy bajos de oxистерoles (Emanuel *et al.*, 1991, α -CE = ND, β -CE = 2 ppm, 7 β -HC = ND, 7-HC = 2 ppm; Van de Bovenkamp *et al.*, 1988, α -CE = 0.7 ppm, 7-CC = 0.2 ppm, 25-HC = ND, CT = ND, 7-CC = 0.2 ppm). Estos resultados no están del todo de acuerdo con los del trabajo de Nourooz-Zadeh y Appelqvist (1987), en donde no se detectaron, para el huevo fresco, ninguno de los siguientes oxистерoles: α -CE, β -CE, 7 α -HC, 7 β -HC, 25-HC, CT, 7-CC ni 20-HC. El LD para este método fue de 0.2 ppm sobre materia grasa. Tsai y Hudson (1984) no detectaron CEs en huevo fresco con un método que presentaba un LD de 0.3 ppm.

Por extensión, cabe comentar los resultados obtenidos por diferentes autores para el huevo en polvo obtenido por liofilización, producto en el cual los niveles de oxистерoles son muy parecidos a los del huevo fresco. En la mayoría de los estudios en los que se trabaja con esta muestra se detectan niveles muy bajos de estos compuestos o bien no se detectan. Morgan y Armstrong (1989) detectaron niveles poco apreciables de 7 α -HC, 7 β -HC y 7-CC y no detectaron α -CE. Nourooz-Zadeh y Appelqvist (1987) detectaron trazas de 7-CC (0.1-0.2 ppm sobre lípidos) y no detectaron ninguno de los siguientes OE: α -CE, β -CE, 7 α -HC, 7 β -HC, 25-HC, CT ni 20-HC, con un método que presentaba un LD de 0.2 ppm sobre materia grasa. En concordancia con estos resultados, Fontana *et al.* (1992) no detectaron, α -CE, β -CE, 7 α -HC, 7 β -HC, 25-HC, CT, 7-CC ni 20-HC, con un método que presentaba un LD de 0.3 ppm. Lo propio hicieron Tsai y Hudson (1984) para los CEs con un método que presentaba el mismo LD. En contraposición con todos estos resultados se encuentran los del trabajo de Naber y Bigger (1985), en el que se detectaron niveles elevados de 7-HC (50 ppm), 25-HC (25 ppm) y 7-CC (25 ppm). El 25-HC y el 7-CC se determinaron utilizando el método M2 y el 7-HC utilizando el M1, en ambos la cuantificación se realizó mediante CLAE (apartado II.D., tabla 2, páginas 98-99). La explicación a estos resultados, claramente

discordantes, se podría encontrar en una falta de resolución por parte de los métodos cromatográficos o para el caso del 7-HC en la utilización del método M1, del que forma parte la controvertida saponificación en caliente.

La determinación de oxisteroles en 11 muestras de huevo fresco de distinta procedencia dio lugar a los resultados de la tabla 1. Esta determinación se realizó por duplicado, siguiendo el método 3, que ha sido descrito anteriormente en el apartado IV.B.2.5. (páginas 234-242). Se tomaron 4 g de huevo fresco, los tiempos de agitación magnética aplicados para la extracción de la grasa fueron los que constan en la tabla 1 del apartado IV.A.1. (página 157). La determinación cromatográfica se realizó en un cromatógrafo Perkin-Elmer modelo Autosystem y el 19-HC se utilizó como patrón interno.

Tabla 2-Contenidos de oxisteroles en huevo fresco (ppm).

Muestra	α -CE ^a	7 β -HC	CT	7-CC	25-HC
1	ND ^b	0.18	ND	0.44	ND
2	ND	0.21	ND	0.54	ND
3	ND	0.18	ND	0.33	ND
4	ND	0.20	ND	0.64	ND
5	ND	0.27	ND	0.71	ND
6	ND	0.18	ND	0.59	ND
7	ND	0.28	ND	0.78	ND
8	ND	0.17	ND	0.16	ND
9	ND	0.22	ND	0.61	ND
10	ND	0.19	ND	0.65	ND
11	ND	0.21	ND	0.66	ND
\bar{X} =	--	0.21	--	0.56	--
CV (%) ^c =	--	17.92	--	32.50	--

^a Símbolos: α -CE (5,6 α -epoxi-5 α -colestano-3 β -ol), 7 β -HC (colest-5-en-3 β ,7 β -diol), CT (5 α -colestano-3 β ,5,6 β -triol), 7-CC (3 β -hidroxicolest-5-en-7-ona), 25-HC (colest-5-en-3 β ,25-diol).

^b No detectado (límites de detección: α -CE = 0.05 ppm; CT = 0.04 ppm ; 25-HC = 0.03 ppm).

^c Coeficiente de variación en tanto por ciento.

Como vemos en la tabla 1 los niveles de OE en huevo fresco son muy bajos, lo cual concuerda con los resultados obtenidos por otros autores. Además, la comprobación de que el colesterol no sufre oxidación durante la manipulación que supone el método analítico nos hace pensar en que el origen del 7 β -HC y del 7-CC en el huevo fresco se encuentra en la biosíntesis por parte de la ponedora, fenómenos de oxidación *in vivo* o bien en la dieta de la misma.

Por otro lado, también se liofilizaron huevos frescos y se analizó su contenido en OE antes y después de la liofilización. La determinación se realizó por duplicado, siguiendo el método 3, que se ha descrito anteriormente en el apartado IV.B.2.5. (páginas 234-242). Se tomaron 4 g de huevo fresco o 1 g de huevo liofilizado, los tiempos de agitación magnética aplicados para la extracción de la grasa fueron los que constan en la tabla 1 del apartado IV.A.1. (página 157). La determinación cromatográfica se realizó en un cromatógrafo Perkin-Elmer modelo Autosystem y el 19-HC se utilizó como patrón interno. Los resultados de esta determinación figuran en la tabla 2.

Tabla 2-Contenidos en oxisteroles de 5 muestras de huevo liofilizado y sus correspondientes huevos frescos de partida.

Huevo fresco de partida	α -CE ^a	7 β -HC	CT	7-CC	25-HC
1	ND ^b	0.98	ND	1.01	ND
2	TR ^c	ND	ND	0.42	ND
3	TR	ND	ND	0.47	ND
4	TR	ND	ND	0.51	ND
5	ND	0.67	ND	0.76	ND
\bar{X} =	--	0.83	--	0.63	--
CV (%) ^d =	--	26.57	--	39.06	--
Huevo liofilizado	α -CE	7 β -HC	CT	7-CC	25-HC
1	ND	1.21	ND	1.03	ND
2	0.18	ND	ND	0.52	ND
3	0.24	ND	ND	0.59	ND
4	0.16	ND	ND	0.49	ND
5	ND	0.87	ND	0.98	ND
\bar{X} =	0.19	1.04	--	0.72	--
CV (%) ^d =	21.53	23.12	--	36.22	--

^a Símbolos: α -CE (5,6 α -epoxi-5 α -colestan-3 β -ol), 7 β -HC (colest-5-en-3 β ,7 β -diol), CT (5 α -colestan-3 β ,5,6 β -triol), 7-CC (3 β -hidroxicolest-5-en-7-ona), 25-HC (colest-5-en-3 β ,25-diol).

^b No detectado (límites de detección: α -CE = 0.05 ppm, 7 β -HC = 0.04 ppm, CT = 0.04 ppm, 25-HC = 0.03).

^c Trazas (< límite de cuantificación; α -CE = 0.13 ppm).

^d Coeficiente de variación en tanto por ciento.

En esta tabla, podemos ver que la formación de oxisteroles durante la liofilización es inapreciable lo cual está de acuerdo con los resultados obtenidos por diversos autores.

2. CONTENIDOS DE OXISTEROLES EN OVOPRODUCTOS COMERCIALES.

El contenido de oxisteroles en huevo pasteurizado ha sido poco estudiado, a pesar de que la pasteurización es un proceso que se aplica sobre el huevo de forma previa a la atomización y de que, asimismo, el huevo líquido pasteurizado es un producto de creciente uso en hostelería.

En nuestro trabajo se determinaron los OE en cinco muestras de huevo pasteurizado que habían sido conservadas a - 20 °C durante 1 mes. Los resultados obtenidos figuran en la tabla 3. La determinación se realizó por duplicado, siguiendo el método 3, que ha sido descrito anteriormente en el apartado IV.B.2.5. (páginas 234-242). Se tomaron 4 g de huevo pasteurizado, los tiempos de agitación magnética aplicados para la extracción de la grasa fueron los que constan en la tabla 1 del apartado IV.A.1. (página 157). La determinación cromatográfica se realizó en un cromatógrafo Perkin-Elmer modelo Autosystem y el 19-HC se utilizó como patrón interno.

Tabla 3-Contenidos de oxisteroles en muestras de huevo pasteurizado (ppm).

Muestra	α -CE ^a	7 β -HC	CT	7-CC	25-HC
1	0.38	1.52	0.29	1.12	ND ^b
2	0.43	1.34	0.33	1.21	ND
3	0.39	1.31	0.36	1.32	ND
4	0.36	1.49	0.25	1.21	ND
5	0.45	1.62	0.37	1.36	ND
\bar{X} =	0.40	1.46	0.32	1.24	
CV(%) ^c =	9.21	8.88	15.63	7.72	

^a Símbolos: α -CE (5,6 α -epoxi-5 α -colest-3 β -ol), 7 β -HC (colest-5-en-3 β ,7 β -diol), CT (5 α -colest-3 β ,5,6 β -triol), 7-CC (3 β -hidroxicolest-5-en-7-ona), 25-HC (colest-5-en-3 β ,25-diol).

^b No detectado (límite de detección del 25-HC = 0.03 ppm).

^c Coeficiente de variación en tanto por ciento.

El contenido de oxisteroles en huevo en polvo comercial ha sido estudiado por diversos autores (Fontana *et al.*, 1992; Nourooz-Zadeh y Appelqvist, 1987; Pie *et al.*, 1990; Tsai y Hudson, 1985; Van de Bovenkamp *et al.*, 1988), quienes han encontrado contenidos muy dispares en este producto (tabla 4). Esta gran variabilidad es debida a la multitud de factores, ya comentados, que influyen en la formación de OE durante la elaboración de huevo en polvo.

Tabla 4-Contenidos de oxisteroles encontrados por diversos autores en huevos en polvo comerciales (ppm) recién elaborados y almacenados durante períodos inferiores a los 12 meses.

Compuesto	Fontana <i>et al.</i> , 1992	Nourooz y Zadeh y Appelqvist, 1987	Pie <i>et al.</i> , 1990	Van de Bovenkamp, <i>et al.</i> , 1988
α -CE ^a	5.3	ND ^b -0.3	16.6-47.3	6.4-35.8
β -CE	4.9	ND-1.3	40.3-62.7	-- ^c
7 α -HC	7.8	ND-1.0	21.6-34.4	21.2-64.9
7 β -HC	9.0	ND-1.1	23.1-43.3	
25-HC	ND	ND	TR ^d -3.0	0.4-2.3
CT	ND	ND-TR	TR	ND-0.5
7-CC	9.1	ND-0.4	22.4-32.7	3.2-11.2
20-HC	ND	ND-0.1	4.8-9.1	--

^a Símbolos: α -CE (5,6 α -epoxi-5 α -colestán-3 β -ol), 7 β -HC (colest-5-en-3 β ,7 β -diol), CT (5 α -colestán-3 β ,5,6 β -triol), 7-CC (3 β -hidroxicolest-5-en-7-ona), 25-HC (colest-5-en-3 β ,25-diol)

^b Trazas (< límite de cuantificación)

^c No detectado.

^d No determinado.

^e Trazas.

La determinación de oxisteroles en 10 huevos en polvo comerciales de distinta procedencia dio lugar a los resultados de la tabla 5. Esta determinación se realizó por duplicado, siguiendo el método 3, que ha sido descrito anteriormente en el apartado IV.B.2.5. (páginas 234-242). Se tomaron 0.65 g de huevo en polvo, los tiempos de agitación magnética aplicados para la extracción de la grasa fueron los que constan en la tabla 1 del apartado IV.A.1. (página 157). la determinación cromatográfica se realizó en un cromatógrafo Perkin-Elmer modelo Autosystem y el 19-HC se utilizó como patrón interno.

Tabla 5-Contenidos de oxisteroles en muestras de huevo en polvo comercial (ppm).

Muestra	α -CE ^a	7 β -HC	CT	7-CC	25-HC
1	7.54	11.21	7.11	23.63	1.22
2	4.71	12.81	2.06	10.35	1.12
3	19.25	47.41	9.27	31.79	2.36
4	19.12	35.00	14.16	35.14	0.72
5	12.21	17.81	8.89	21.16	0.53
6	8.03	16.04	9.72	23.05	0.63
7	6.21	25.61	0.71	13.25	TR ^b
8	3.81	10.56	2.82	8.16	0.62
9	10.62	25.12	8.69	24.11	1.15
10	4.11	13.16	3.99	14.15	0.83
\bar{X} =	9.56	21.47	6.74	20.48	1.02 ^c
CV(%) ^d =	60.12	55.92	62.56	43.67	55.25

^a Símbolos: α -CE (5,6 α -epoxi-5 α -colestan-3 β -ol), 7 β -HC (colest-5-en-3 β ,7 β -diol), CT (5 α -colestan-3 β ,5,6 β -triol), 7-CC (3 β -hidroxicolest-5-en-7-ona), 25-HC (colest-5-en-3 β ,25-diol).

^b Trazas (< límite de cuantificación; 25-HC = 0.52 ppm).

^c n = 9.

^d Coeficiente de variación en tanto por ciento.

En parte, la gran variabilidad de contenidos en estas muestras de huevo en polvo viene explicada por el hecho de que el período de almacenamiento no es el mismo para todas las muestras (oscila entre 3 y 12 meses). Además, esta variabilidad también estaría en función de las condiciones de procesado de cada muestra, que si bien no han sido controladas, difícilmente habrán sido idénticas.

3.BIBLIOGRAFÍA.

Emanuel, H.A., Hassel, C.A., Addis, P.B., Bergmann, S.D. y Zavoral, J.H. (1991). Plasma cholesterol oxidation products (oxysterols) in human subjects fed a meal rich in oxysterols. *J. Food Sci.* **56**, 843-847.

Fontana, A., Antoniazzi, F., Cimino, G., Mazza, G., Trivellone, E. y Zanone, B. (1992). High resolution NMR detection of cholesterol oxides in spray-dried egg yolk. *J. Food Sci.* **57**, 869-879.

Morgan, J.N. y Armstrong, D.J. (1989). Wide-bore capillary gas chromatographic method for quantification of cholesterol oxidation products in egg yolk powder. *J. Food Sci.* **54**, 427-429, 457.

Naber, E.C. y Biggert, M.D. (1985). Analisis for and generation of cholesterol oxidation products in egg yolk by heat treatment. *Poult. Sci.* **64**, 341-347.

Nourooz-Zadeh, J. y Appelqvist, L-Å. (1987). Cholesterol oxides in swedish foods and food ingredients: Fresh eggs and dehydrated egg products. *J. Food Sci.* **52**, 57-62, 67.

Pennock, H.F., Neiss, G. y Mahler, H.R. (1962). Biochemical studies on the developing avian embryo. *Biochem. J.* **85**, 530-537.

Pie, J.E., Spahis, K. y Seillan, C. (1990). Evaluation of oxidative degradation of cholesterol in food and food ingredients: Identification and quantification of cholesterol oxides. *J. Agric. Food Chem.* **38**, 973-979.

Tsai, L.S. y Hudson, C.A. (1984). Cholesterol oxides in commercial dry egg products: Isolation and identification. *J. Food Sci.* **49**, 1245-1248.

Tsai, L.S. y Hudson, C.A. (1985). Cholesterol oxides in commercial dry egg products: Quantitation. *J. Food Sci.* **50**, 229-231, 237.

Van de Bovenkamp, P., Kosmeijer-schuil, T.G. y Katan, M.B. (1988). Quantification of oxysterols in dutch foods: Egg products and mixed diets. *Lipids* **23**, 1079-1085.

IV.D. FORMACIÓN DE OXIESTEROLES EN HUEVO EN POLVO PRODUCIDO POR ATOMIZACIÓN.

1. Introducción.	341
2. Formación de oxистерoles durante la producción de huevo en polvo: efecto de la temperatura de atomización.	347
3. Formación de oxистерoles durante la producción y almacenamiento de huevo en polvo: efecto de la temperatura, tipo y concentración de antioxidante condiciones de envasado y tiempo de conservación.	401

IV.D.1.INTRODUCCIÓN.

De los diferentes ovoproductos, el huevo en polvo es el más utilizado a nivel de industria alimentaria y, además, presenta una importancia creciente en el campo de la hostelería. Los métodos de secado que permiten obtener este producto son diversos: mediante corriente de aire caliente con el huevo dispuesto en forma de espuma sobre una cinta transportadora, liofilización y atomización (Bergquist, 1964, 1977). De estos métodos, el menos utilizado es la liofilización, debido al elevado coste del proceso, que no hace factible la aplicación rentable de esta técnica a nivel industrial. No obstante, los ovoproductos liofilizados son los más fácilmente reconstituibles y, al mismo tiempo, los que sufren menor alteración durante el proceso de deshidratación. Así, la presencia de oxiesteroles en huevo en polvo obtenido por liofilización no es detectada (Fontana *et al.*, 1992; Tsai y Hudson, 1984) o es prácticamente nula (Morgan y Armstrong, 1989; Nourooz-Zadeh y Appelqvist, 1987).

La atomización, en cambio, es el método más ampliamente utilizado en la obtención de huevo en polvo. Este proceso implica la formación de oxiesteroles en el sustrato, fenómeno que depende básicamente de dos factores:

- 1) de si el aire, que ejerce el efecto secante, ha sido calentado directa o indirectamente (Missler *et al.*, 1985; Morgan y Armstrong, 1987, 1992; Tsai y Hudson, 1985);
- 2) de las temperaturas de entrada y salida del aire en el cuerpo del atomizador (Morgan y Armstrong, 1987, 1992; Tsai y Hudson, 1985).

Se ha comprobado que si el aire se calienta indirectamente la formación de OE es mucho menor que si se calienta directamente mediante la llama de un quemador. Esto es debido, según diversos autores, a la presencia de óxidos de nitrógeno (NO y NO₂) en el aire calentado directamente. Estos compuestos se forman durante la combustión del gas en el quemador (Missler *et al.*, 1985; Morgan y Armstrong, 1987, 1992; Tsai y Hudson, 1985).

Además de estos dos factores que influyen, de una forma ampliamente comprobada, sobre la formación de oxiesteroles, existen otra serie de factores mucho menos estudiados que, muy

probablemente, también influyen sobre esta formación y que deben ser controlados durante la atomización. Estos factores son:

- el tipo de atomizador;
- el tiempo de permanencia del producto en el interior del atomizador;
- la velocidad de flujo a la que es inyectado el huevo líquido en el atomizador.

Los atomizadores se pueden dividir en tipo caja y en tipo ciclón. En los de tipo caja, el huevo líquido es inyectado horizontalmente desde un extremo de la cámara rectangular, las partículas de huevo desecadas se depositan en el fondo de la cámara y son trasladadas mecánicamente al extremo opuesto al de inyección, donde son descargadas. En cambio, en el de tipo ciclón, el huevo líquido es inyectado desde la parte superior de la cámara que presenta un fondo cónico, las partículas de huevo desecadas llegan al fondo por gravedad y salen de la cámara inmediatamente acompañando al aire caliente. La diferencia más importante entre estos dos tipos de atomizador es que el tiempo de permanencia del producto desecado es superior en los atomizadores de tipo caja.

El tiempo de permanencia es un factor muy importante, pues, cuanto mayor es más elevada es la temperatura que alcanzan las partículas desecadas y, lógicamente, mayor es la alteración del producto.

La velocidad de flujo a la que es inyectado el huevo líquido en el interior del atomizador influye directamente en la temperatura del aire a la salida del cuerpo del atomizador. Así, para una misma temperatura de entrada del aire, cuanto mayor sea la velocidad de flujo menor será la temperatura de salida de este aire. Esta temperatura de salida es la más representativa de la temperatura a la que llega la partícula desecada en el interior del atomizador.

BIBLIOGRAFÍA.

Bergquist, D.H. (1964). Eggs. En *Food dehydration II. Products and technology* (W.B. Van Arsdell y M.J. Copley, Ed.). p. 652-693. AVI publishing company Inc., Westport, Connecticut, EUA.

Bergquist, D.H. (1977). Egg dehydration. En *Egg science & technology* (W.J. Stadelman y O.J. Cotterill, Ed.). p. 197-229. AVI publishing company Inc., Westport, Connecticut, EUA.

Fontana, A., Antoniazzi, F., Cimino, G., Mazza, G., Trivellone, E. y Zanone, B. (1992). High resolution NMR detection of cholesterol oxides in spray-dried egg yolk. *J. Food Sci.* **57**, 869-879.

Missler, S.R., Wasilchuk, B.A. y Merritt, C. (1985). Separation and identification of cholesterol oxidation products in dried egg preparations. *J. Food Sci.* **50**, 595-598, 646.

Morgan, J.N. y Armstrong, D.J. (1987). Formation of cholesterol-5,6-epoxides during Spray-drying of egg yolk. *J. Food Sci.* **52**, 1224-1227.

Morgan, J.N. y Armstrong, D.J. (1989). Wide-bore capillary gas chromatographic method for quantification of cholesterol oxidation products in egg yolk powder. *J. Food Sci.* **54**, 427-429, 457.

Morgan, J.N. y Armstrong, D.J. (1992). Quantification of cholesterol oxidation products in egg yolk powder spray-dried with direct heating. *J. Food Sci.* **57**, 43-45, 107.

Nourooz-Zadeh, J. y Appelqvist, L-Å. (1987). Cholesterol oxides in swedish foods and food ingredients: Fresh eggs and dehydrated egg products. *J. Food Sci.* **52**, 57-62, 67.

Tsai, L.S. y Hudson, C.A. (1984). Cholesterol oxides in commercial dry egg products: Isolation and identification. *J. Food Sci.* **49**, 1245-1248.

Tsai, L.S. y Hudson, C.A. (1985). Cholesterol oxides in commercial dry egg products: Quantitation. *J. Food Sci.* **50**, 229-231, 237.

IV.D.2. FORMACIÓN DE OXIESTEROLES DURANTE LA PRODUCCIÓN DE HUEVO EN POLVO: EFECTO DE LA TEMPERATURA DE ATOMIZACIÓN.

1. INTRODUCCIÓN.	349
2. MUESTRAS Y MATERIAL.	349
1. Muestras.	349
1. Preparación del huevo congelado para la atomización.	349
2. Proceso de atomización: obtención de las muestras de huevo en polvo.	350
2. Material y reactivos.	354
3. Patrones.	354
3. MÉTODOS, RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	355
1. Determinación de la humedad.	355
1. Estudio comparativo entre dos métodos para la determinación de la humedad en huevos y ovoproductos.	356
2. Metodología analítica.	358
3. Resultados y discusión.	361
2. Determinación del índice de peróxidos.	362
1. Metodología analítica.	363
2. Resultados y discusión.	364
3. Determinación del índice de <i>p</i> -anisidina.	364
4. Determinación de las extinciones específicas al UV (K_{232} , K_{270} y K_{303}).	365
1. Metodología analítica.	366
1. Extracción de la grasa.	366
2. Determinación.	367
2. Resultados y discusión.	368
5. Determinación del color.	370
1. Metodología analítica.	372
2. Precisión del método.	374
3. Resultados y discusión.	375



6. Determinación de la intensidad de pardeamiento producido por la reacción de Maillard.	376
1. Metodología analítica.	378
2. Precisión del método.	378
3. Resultados y discusión.	379
7. Determinación de los oxisteroles.	380
1. Resultados y discusión.	381
1. Formación de oxisteroleso en el huevo en polvo: efecto de la temperatura de atomización.	381
2. Estudio de las correlaciones entre la formación de oxisteroles en huevo en polvo y los demás parámetros de calidad evaluados.	388
8. Determinación del colesterol.	397
1. Resultados y discusión.	397
4. BIBLIOGRAFÍA.	398

1.INTRODUCCIÓN.

El control de calidad en la producción de huevo en polvo se realiza mediante una serie de determinaciones, de las cuales la mayoría miden el grado de alteración del producto. En nuestro estudio, se intentó correlacionar la formación de oxiesteroles durante el proceso de atomización con parámetros que miden la alteración del producto, alguno de ellos utilizado a nivel rutinario en el control de calidad, como es la pérdida de color, y otros más específicos, como la intensidad de pardeamiento producido por la reacción de Maillard y ciertos parámetros de oxidación (índice de peróxidos y absorción al UV).

2.MUESTRAS Y MATERIAL.

2.1.MUESTRAS.

Se analizaron muestras de huevo congelado y de huevo en polvo. Las muestras de huevo en polvo fueron obtenidas a partir de las de huevo congelado mediante atomización a diferentes condiciones de temperatura.

2.1.1.PREPARACIÓN DEL HUEVO CONGELADO PARA LA ATOMIZACIÓN.

Para realizar este estudio se partió de 6 lotes de huevo congelado de distinta procedencia que habían sido almacenadas entre 5 y 9 meses. De cada uno de estos huevos se descongeló un contenedor de 10 kg y se homogeneizó durante 1 minuto a 20000 rpm mediante un homogeneizador (Ystral electric drive 10/20 3000). A continuación, se tomó una muestra de 650 g de cada uno de los seis contenedores. Parte de cada una de estas muestras tomadas se analizó para conocer su humedad, color, índice de peróxidos, absorción al UV y contenido en colesterol y en OE (figura 1). Las cantidades restantes de cada muestra fueron de nuevo almacenadas a -20 °C hasta su atomización.

De forma previa a la atomización, estas cantidades restantes fueron de nuevo homogeneizadas durante 30 segundos a 20000 rpm mediante el mismo homogeneizador y divididas en tres partes (una parte para cada una de las tres condiciones de temperatura de atomización

ensayadas). A cada una de estas tres partes se les añadió un 25 % de agua con el fin de controlar con mayor facilidad la alimentación del atomizador.

2.1.2. PROCESO DE ATOMIZACIÓN: OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS DE HUEVO EN POLVO

Para los estudios de atomización se utilizó un atomizador piloto (Niro Atomizer A/S, Copenhagen, Dinamarca) equipado con un calefactor eléctrico (fuente de calor indirecta) (figura 2). La relación de alimentación (10 ml/min), presión de aire (6 kg/cm²) y tiempo de permanencia del huevo en polvo en el atomizador (25 min) se mantuvieron constantes para todas las pruebas.

Las temperaturas de entrada y de salida del aire en el cuerpo del atomizador fueron ajustadas, simultáneamente, mediante la variación del flujo de aire a través del sistema. Para nuestro estudio, se trabajó con tres condiciones diferentes de temperatura (T_A , T_B y T_C):

T_A) T° entrada del aire = 180 °C - T° salida = 120 °C;

T_B) T° entrada del aire = 193 °C - T° salida = 128 °C;

T_C) T° entrada del aire = 231 °C - T° salida = 142 °C.

Estas tres condiciones de temperatura se encuentran dentro del rango de temperaturas utilizadas, a nivel experimental, para el estudio de formación de OE durante la obtención de huevo en polvo por atomización con fuente de calor indirecta (Morgan y Armstrong, 1987). No obstante, en las últimas décadas, a nivel industrial, existe una marcada tendencia hacia la utilización de temperaturas lo más bajas posibles para la obtención de huevo en polvo por este método (Bergquist, 1964, 1977; Tsai y Hudson, 1985). De las tres condiciones ensayadas, las dos primeras se situarían en la parte alta del rango de temperaturas usadas a nivel industrial, mientras que la tercera de las condiciones quedaría fuera de este rango.

Según esto, a partir de cada una de las 6 muestras de huevo congelado se obtuvieron 3 muestras de huevo en polvo producidas a diferentes temperaturas de atomización. De estas

18 muestras de huevo en polvo se analizó, como se había hecho anteriormente con las de huevo congelado, su humedad, color, índice de peróxidos, absorción al UV, contenido en OE y en lugar del contenido en colesterol el pardeamiento de Maillard. La figura 1 presenta un esquema de la preparación de las muestras a analizar.

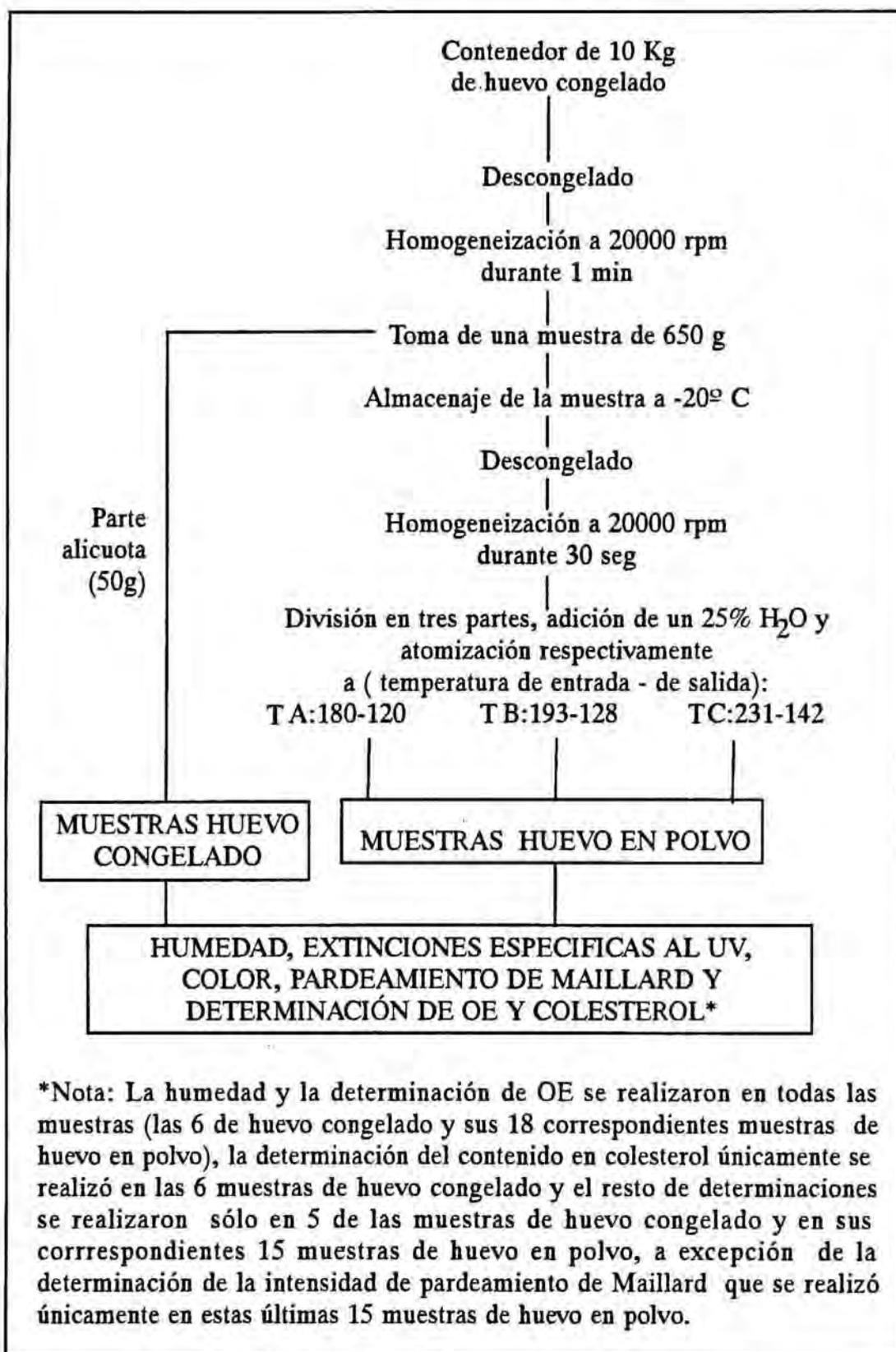


Figura 1-Preparación de las muestras.

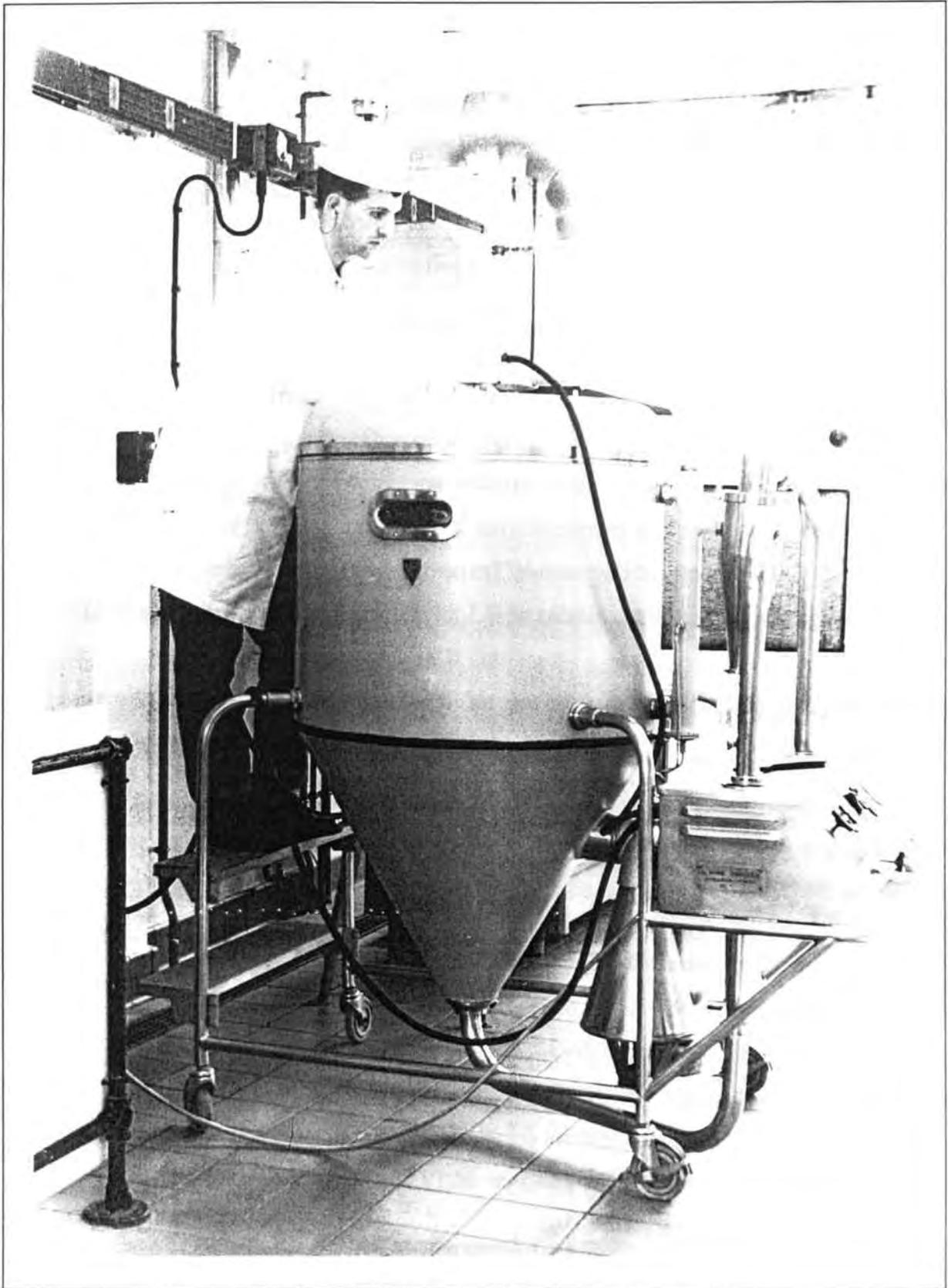


Figura 2-Fotografía del atomizador usado en la preparación de las muestras de huevo en polvo.

2.2.MATERIAL Y REACTIVOS.

Los diferentes disolventes utilizados fueron de la calidad y procedencia que se indican a continuación: el cloroformo (ACS), el iso-octano (UV-IR), el metanol (ACS), el ciclohexano (UV-IR), la acetona (ACS), el éter dietílico (ACS) y el hexano (mezcla de alcanos, para análisis) fueron comprados a Panreac, Montplet & Esteban (Barcelona, España); y el ácido acético glacial (ACS), el acetato de etilo (ACS) y la piridina desecada (máximo 0.01 % de agua, para análisis) a Merck (Darmstadt, Alemania).

El resto de reactivos utilizados poseían la calidad y procedencia siguientes: la arena de mar lavada, el ácido tricloroacético (para análisis), el hidróxido sódico (para análisis) y el sulfato sódico anhidro (para análisis) fueron suministrados por Panreac; el tiosulfato sódico pentahidratado (ACS) por Merck; la *p*-anisidina por Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO); y el Sylon BTZ (N,O-bis(trimetilsilil)acetamida/Trimetilclorosilano/N-trimetilsililimidazol, 3:2:3, para investigación) en ampollas selladas de 0.1 ml por Supelco, Inc. (Bellefonte, PA).

Los cartuchos de gel de sílice (Sep-Pak cartridges, ref. 51900, Waters, división de Millipore, Milford, MA).

2.3.PATRONES.

La mayoría de los patrones empleados fueron proporcionados por Sigma Chemical Co. y presentaron las siguientes purezas determinadas mediante diferentes técnicas cromatográficas: colesterol-5 α ,6 α -epóxido del 99 % (5,6 α -epoxi-5 α -colestan-3 β -ol¹, por CCF²). el 7 β -hidroxicolesterol del > 99 % (colest-5-en-3 β ,7 β -diol, por CCF), el colestantriol del > 97 % (5 α -colestan-3 β ,5,6 β -triol, por CG), el 7-cetocolesterol del > 99 % (3 β -hidroxicolest-5-en-7-ona, por CLAE), el 25-hidroxicolesterol del > 98 % (colest-5-en-3 β .25-diol, por CCF) y el 19-hidroxicolesterol del > 99 % (colest-5-en-3 β ,19-diol, CCF).

¹ Nombre sistemático.

² Técnica cromatográfica por la que se determinó la pureza.

Los únicos patrones no suministrados por Sigma fueron: el colesterol (colest-5-en-3 β -ol) y el β -caroteno, Merck, ambos para fines bioquímicos y con purezas respectivas del >99% (por CG) y del >97% (por espectrofotometría).

Todos estos patrones se pesaron en una balanza Sartorius, modelo 2004 MP, que permitía apreciar hasta la centésima de mg. De los patrones usados en la determinación de OE, para su manipulación, se prepararon disoluciones en acetato de etilo de concentración 2.5 mg/10 ml para el 19-HC y de 2 mg/10 ml para el resto. Estas soluciones una vez preparadas se conservaron, un máximo de dos meses, encapsuladas en viales de color topacio a - 20 °C. Las diluciones que fue necesario preparar a partir de estas soluciones se realizaron en el momento de su uso, también con acetato de etilo.

3.MÉTODOS, RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

3.1.DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD.

De los diferentes métodos para la determinación de la humedad en huevos y ovoproductos, se acepta de forma generalizada, que el más exacto es el método oficial de la AOAC (925.30, 1990). No obstante, este método presenta el inconveniente de contar entre el utillaje necesario para llevarlo a cabo con una estufa de vacío, aparato del que no se puede disponer en muchos laboratorios. Entre los métodos alternativos al método de la AOAC se encuentran una serie de métodos más o menos exactos, de los cuales destacan (Egan *et al.* 1981; Gorman, 1977):

- por medio de infrarrojos;
- por refractometría;
- mediante microondas;
- mediante estufa atmosférica.

De estos métodos alternativos los dos primeros son muy rápidos pero poco exactos y son utilizados en control de calidad en la elaboración de ovoproductos. En cambio, el último de estos métodos es más exacto.

3.1.1. ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE DOS MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD EN HUEVOS Y OVOPRODUCTOS.

Con el fin de conocer cual era la diferencia de exactitud y precisión entre el método oficial de la AOAC y el método que utiliza la estufa atmosférica, se planteó un estudio comparativo entre estos dos métodos. Para ello, se determinó por quintuplicado, mediante los dos métodos, la humedad de las tres muestras de huevo en polvo procedentes de la muestra número 5 de huevo congelado. Los resultados de estas determinaciones, expresados como % de residuo seco, figuran en la tabla 1.

Tabla 1-Resultados del estudio comparativo entre el método oficial de la AOAC y el que utiliza la estufa atmosférica.

MÉTODO AOAC			
REPETICIÓN	T _A ^a	T _B ^a	T _C ^a
1	98.46	97.55	98.40
2	98.49	97.56	98.40
3	98.50	97.59	98.44
4	98.44	97.60	98.38
5	98.46	97.61	98.42
$\bar{X} =$	98.47	97.58	98.41
CV (%) ^b =	0.025	0.026	0.023
MÉTODO ESTUFA ATMOSFÉRICA			
REPETICIÓN	T _A	T _B	T _C
1	98.69	97.80	98.55
2	98.64	97.78	98.59
3	98.72	97.79	98.51
4	98.69	97.75	98.56
5	98.70	97.84	98.56
$\bar{X} =$	98.69	97.79	98.55
CV (%) =	0.029	0.033	0.029

^a T = temperaturas de atomización (temperatura de entrada-salida): T_A (180°C-120°C), T_B (193°C-128°C) y T_C (231°C-142°C).

^b Coeficiente de variación en tanto por ciento.

En esta tabla podemos observar que la diferencia de exactitud entre los dos métodos, para las diferentes muestras, fue muy pequeña. No obstante, para saber si esta diferencia era

estadísticamente significativa para alguna de las tres muestras, se aplicó la prueba de la t de Student-Fisher, resultando ser significativa para los tres casos. Por otro lado, el método de la AOAC es un poco más preciso que el que utiliza la estufa atmosférica. A pesar de ello, como la magnitud de la diferencia de exactitud fue muy pequeña para las tres muestras (< 0.3 %) y la diferencia de precisión fue prácticamente irrelevante, se optó por utilizar, para la determinación de la humedad en las muestras de huevo congelado y en polvo, el método que trabaja con estufa atmosférica y que se describe a continuación (Leatherhead Food Research Association, 1987).

3.1.2.METODOLOGÍA ANALÍTICA.

Para el huevo congelado: a una cápsula de acero inoxidable de 8.2 cm de diámetro y 1.8 cm de altura, con su correspondiente tapa, se le añadieron 25 g de arena y una varilla de vidrio. Se introdujo la cápsula destapada (según figura 3) en una estufa a $105\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ durante 30 minutos. Seguidamente, se tapó la cápsula, se sacó de la estufa e inmediatamente se colocó en un desecador hasta que se enfrió (aproximadamente 45 min). Entonces se pesó todo el conjunto seco (cápsula con tapa, arena y varilla) (P_1) y se introdujeron en la cápsula unos 4 g de muestra, exactamente pesados (P_2). A continuación, se interpuso la muestra con la arena, formando una masa, y se colocó la cápsula sobre un baño-maría a aproximadamente $95\text{ }^{\circ}\text{C}$. Periódicamente, a medida que la masa iba tomando consistencia, se iba triturando suavemente con la varilla hasta conseguir friabilidad. Esta operación se realizó, en todas las ocasiones, colocando la cápsula sobre una lámina de papel para evitar la pérdida de partículas durante la misma. Se colocó la cápsula con su contenido destapada en la estufa durante 2 horas. Pasado este tiempo, se tapó la misma, se sacó de la estufa, se colocó inmediatamente en un desecador y se dejó enfriar (aproximadamente 45 minutos). Una vez fría, se pesó la cápsula con su contenido. Una vez pesada, la cápsula se colocó de nuevo destapada en la estufa durante 30 minutos, se tapó, se colocó de inmediato en un desecador hasta que se enfrió y se pesó. Esta operación se repitió hasta conseguir un peso constante (P_3) (diferencia entre pesadas sucesivas $\leq 1\text{ mg}$). Los cálculos se realizaron según las fórmulas siguientes:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{(P_1 + P_2) - P_3}{P_2} \cdot 100$$

$$\% \text{ Residuo seco} = \frac{P_3 - P_1}{P_2} \cdot 100$$

P_1 = peso de la cápsula con tapa, arena y varilla secas;

P_2 = peso de muestra;

P_3 = peso de la cápsula con tapa, arena, varilla y muestra secas.

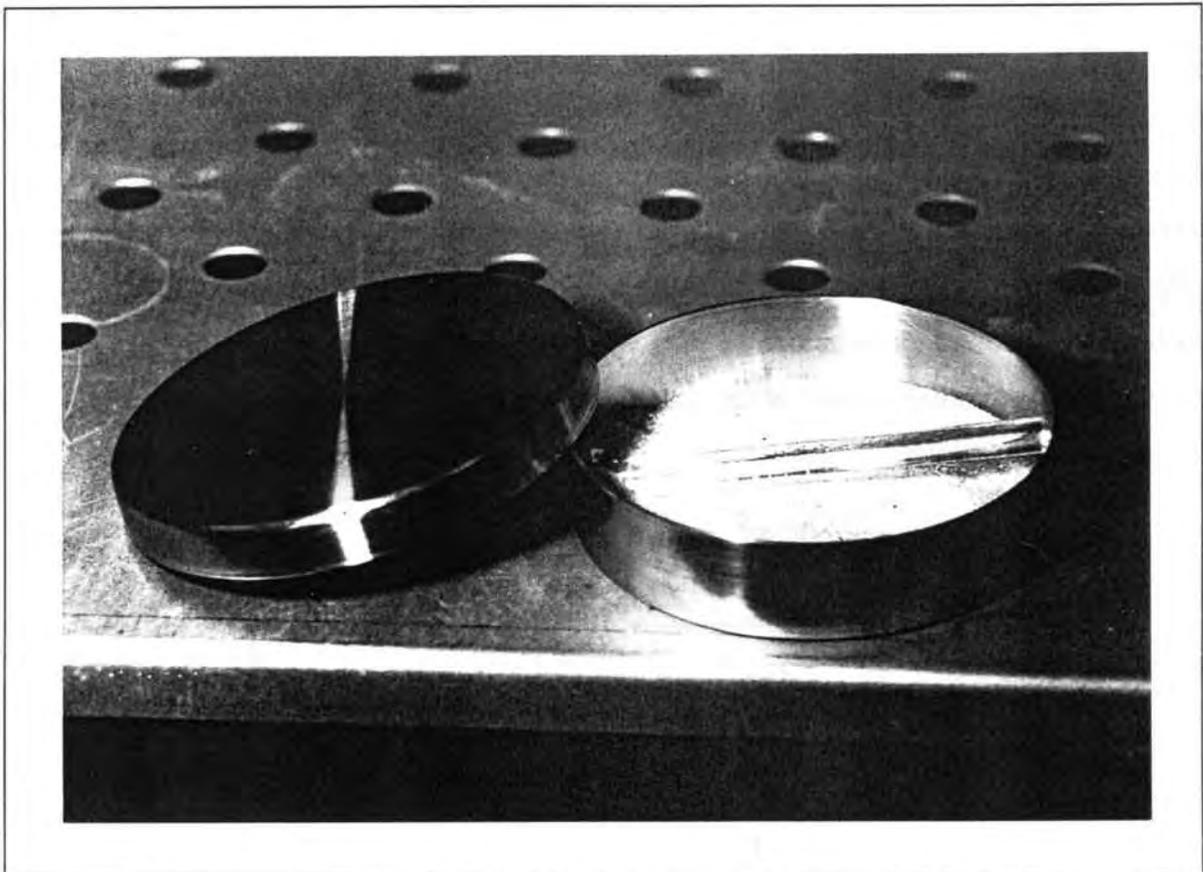


Figura 3-Forma en que se colocó la cápsula destapada en la estufa.

En la figura 3 también vemos como se debe colocar la varilla en caso de que sea necesario su uso para la determinación de la humedad. La colocación de esta varilla se realiza de tal manera que el extremo no achatado, por el que se la coge, no debe tocar la arena para evitar pérdidas de material durante la manipulación de la muestra con la varilla.

Para el huevo en polvo: se introdujo, durante 30 minutos en una estufa a $105\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$, una cápsula destapada del mismo tipo que la anterior. Pasado este tiempo, se tapó, se sacó de la estufa y se colocó inmediatamente en un desecador hasta que se enfrió (aproximadamente 45 minutos). La cápsula una vez fría se pesó (P_1). A continuación, se introdujeron en la cápsula unos 1.8 g de muestra, exactamente pesados (P_2). Esta cápsula con la muestra (destapada) se colocó en la estufa durante 4 horas. Pasado este tiempo, se tapó cuidadosamente para no perder muestra, se sacó de la estufa, se colocó inmediatamente en un desecador hasta que se enfrió (aproximadamente 45 minutos) y se pesó. Una vez pesada, la cápsula se colocó de nuevo destapada en la estufa durante 30 minutos, se tapó, se colocó de inmediato en un desecador hasta que se enfrió y se pesó. Se repitió esta operación hasta peso constante (P_3) (diferencia entre pesos sucesivos $\leq 1\text{ mg}$). Los cálculos se realizaron según las fórmulas siguientes:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{(P_1 + P_2) - P_3}{P_2} \cdot 100$$

$$\% \text{ Residuo seco} = \frac{P_3 - P_1}{P_2} \cdot 100$$

P_1 = peso de la cápsula con tapa seca;

P_2 = peso de muestra;

P_3 = peso de la cápsula con tapa y muestra secas.

3.1.3.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las tablas 2 y 3 recogen los resultados que fueron obtenidos en la determinación de la humedad, para las muestras de huevo congelado y en polvo, respectivamente. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado, excepto para las muestras de huevo en polvo procedentes de la muestra número 5 de huevo congelado, en que la humedad se determinó por quintuplicado, como ya se ha comentado anteriormente. Los resultados se expresan como % de sólidos totales o residuo seco, y no como % de H₂O , ya que estos resultados se utilizan posteriormente para expresar el resto de determinaciones analíticas sobre materia seca.

Tabla 2-Resultados de la determinación de la humedad de las muestras de huevo congelado

Muestra	% Residuo seco
1	22.56
2	24.08
3	24.31
4	24.50
5	23.64
6	23.89
$\bar{X} =$	23.83

Tabla 3-Resultados de la determinación de la humedad en las muestras de huevo en polvo, expresados como % de residuo seco.

Muestra huevo congelado de partida	Muestras de huevo en polvo		
	T _A ^a	T _B ^a	T _C ^a
1	98.42	97.70	97.72
2	97.88	98.36	98.19
3	98.23	98.32	97.59
4	97.95	98.24	97.02
5	98.69	97.79	98.55
6	98.01	98.17	98.05
$\bar{X} =$	98.20	98.09	97.85

^a T = temperaturas de atomización (temperatura de entrada-salida): T_A (180°C-120°C), T_B (193°C-128°C), T_C (231°C-142°C)

En la tabla 3 vemos que el valor medio del % de residuo seco presenta diferencias en función de las condiciones de atomización, pero estas diferencias no son estadísticamente significativas (análisis de la variancia para medidas repetidas, $\alpha = 0.05$). Esto posiblemente es debido a que los atomizadores con fuente de calor indirecta (FCI), a diferencia de los que trabajan con fuente de calor directa (FCD), son capaces de obtener productos suficientemente secos a temperaturas relativamente bajas. Esto es debido a que el aire caliente que entra en el cuerpo del atomizador procedente de la FCI es mucho más seco que el que viene de la FCD, ya que este último va cargado con agua procedente de la combustión.

3.2.DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE PERÓXIDOS.

El índice de peróxidos (IP) es un parámetro que ofrece una indicación muy sensible de la evolución del deterioro oxidativo durante sus fases iniciales. No obstante, presenta como principal inconveniente la no distinción entre estados de oxidación muy poco avanzados y estados de oxidación secundaria, ya que en ambos casos se obtienen valores de IP muy bajos. Esto sucede así, ya que en el primer caso prácticamente no se han formado peróxidos,

mientras que en el segundo ya se han descompuesto en compuestos carbonílicos, llamados compuestos de oxidación secundaria. Según esto, siempre un valor bajo de IP, en una muestra presumiblemente oxidada, deberá ir acompañado de alguna determinación paralela que mida la presencia de compuestos de oxidación secundaria (índice de anisidina, determinación de la extinción específica a 270 nm, prueba del ATB, etc.). De esta manera, se obtendrá un buen conocimiento del grado de oxidación del sustrato analizado.

3.2.1. METODOLOGÍA ANALÍTICA.

En nuestro trabajo, la valoración de los peróxidos se realizó mediante el método volumétrico que se basa en la capacidad de los peróxidos (hidroperóxidos + epiperóxidos) para liberar yodo en medio ácido, por oxidación del KI. El índice de peróxidos de una grasa es una medida del contenido de oxígeno reactivo presente en la misma, expresado en términos de miliequivalentes de O_2 por 1000 g de grasa, o como milimoles de peróxido por kilogramo de grasa (1 milimol = 2 miliequivalentes).

Procedimiento para la determinación del IP: se pesaron a precisión alrededor de 1.2 g de grasa en un Erlenmeyer con tapón esmerilado de 250 ml, la grasa había sido extraída previamente por agitación magnética en cloroformo/metanol (2:1, v/v). Sobre la grasa, se añadieron 10 ml de cloroformo y 15 ml de ácido acético glacial, se pasó corriente de N_2 , se tapó rápidamente el Erlenmeyer y se agitó hasta conseguir la disolución de la grasa. Luego se agregó 1 ml de una solución saturada de IK, recién preparada en atmósfera de N_2 en un tubo con tapón de rosca, se pasó corriente de N_2 , se agitó de nuevo durante 1 minuto y se mantuvo al abrigo de la luz durante 5 minutos. A continuación se añadieron 75 ml de agua destilada y se valoró la cantidad de I_2 liberado en la reacción entre los peróxidos y el KI con una solución de tiosulfato sódico 0.002N, utilizando como indicador el engrudo de almidón al 1%.

Al mismo tiempo se realizó un blanco siguiendo el mismo procedimiento, pero sin muestra. En este blanco, si los reactivos no presentan impurezas, el volumen de tiosulfato 0.002N gastado no excederá los 0.3 ml. Hay que poner especial atención en el lavado del material.

Cálculo del IP:

$$IP = \frac{S \cdot N \cdot 1000}{P}$$

S = ml gastados de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, corregidos con el blanco;

N = normalidad del $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$;

P = peso de la muestra en gramos.

3.2.2.RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Los resultados obtenidos en la determinación del índice de peróxidos fueron muy bajos, tanto para las muestras de huevo congelado como para las muestras de huevo en polvo, nunca superiores a 10 miliequivalentes de O_2/Kg . En el caso del huevo en polvo, estos resultados bajos del IP iban asociados a valores altos de la extinción específica a 270 nm, lo cual indica que el sustrato se halla en un estado de oxidación secundaria, donde el nivel de peróxidos es bajo. Según esto, el valor del IP no es un buen parámetro para estudiar la evolución del grado de oxidación del sustrato durante el proceso de atomización, ya que prácticamente no se producen variaciones entre los valores del IP en los huevos congelados de partida y los valores de este parámetro en sus correspondientes muestras de huevo en polvo. Este hecho es debido a la concurrencia de dos factores, el primero, la presencia en el huevo de cantidades apreciables de AGPI con cuatro o más insaturaciones, cuyos peróxidos dan lugar rápidamente a productos de oxidación secundaria y, el segundo, el tratamiento térmico a que se somete el huevo durante su atomización, el cual favorece el paso rápido de los peróxidos a estos compuestos de oxidación secundaria. El bajo interés de los resultados obtenidos en esta determinación, nos llevó a no reflejarlos en este trabajo.

3.3.DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE *p*-ANISIDINA.

Esta determinación, en principio, es válida para aceites vegetales y grasas. Los compuestos aldehídicos del aceite o grasa (compuestos de oxidación secundaria) reaccionan con la *p*-

anisidina en presencia de ácido acético para dar compuestos que presentan un máximo de absorción a 350 nm. La determinación consiste en disolver el aceite o grasa en isooctano UV-IR, añadirle *p*-anisidina disuelta al 0.25 % (p/v) en ácido acético glacial y medir espectrofotométricamente a 350 nm la concentración de los productos de reacción entre la *p*-anisidina y los compuestos aldehídicos, principalmente 2-alquenes (IUPAC, 1986). Esta determinación se intentó explicar sin éxito en la grasa extraída del huevo en polvo, lo mismo sucedió al aplicar este método a la grasa extraída de leches con sustitución de grasa (Gibert, 1992). Ante este problema, se realizó la determinación en muestras de aceites vegetales donde funcionó perfectamente. Según estos resultados quedaría en entredicho la aplicabilidad de este método a todo tipo de grasas.

3.4.DETERMINACIÓN DE LAS EXTINCIONES ESPECÍFICAS

AL UV (K_{232} , K_{270} Y K_{303}).

Las extinciones específicas a ciertas longitudes de onda de la zona UV del espectro han sido utilizadas desde mediados de este siglo para estudiar la evolución de la oxidación en ciertas grasas y aceites. La mayoría de las grasas y aceites presentan en su composición como mínimo, una pequeña cantidad de ácido linoleico. La oxidación de este AG conduce inicialmente a la formación de hidroperóxidos, compuestos con dos dobles enlaces conjugados que absorben alrededor de 232 nm. Si la oxidación de este AG continua se forman compuestos carbonílicos (compuestos de oxidación secundaria) que absorben alrededor de 270 nm. Así las extinciones específicas más utilizadas son las correspondientes a las longitudes de onda 232 y 270 nm. No obstante, en nuestro trabajo también se utiliza la extinción específica a 303 nm. Los compuestos de oxidación que absorben a cada una de estas longitudes de onda son (Galanos *et al.*, 1968; Gunstone, 1986; Uzzan, 1956; Wolff, 1954, 1968):

232 nm, moléculas con dos dobles enlaces conjugados, entre las cuales están los hidroperóxidos del ácido linoleico y otros compuestos con estructura diénica conjugada que se forman a partir de su descomposición;

270 nm, moléculas con tres dobles enlaces conjugados, entre las cuales se encuentran compuestos carbonílicos de oxidación secundaria, particularmente dicetonas al-

insaturadas y cetonas alfa, β -etilénicas, y compuestos con estructura triénica conjugada procedentes de la oxidación de AGPI con tres o más insaturaciones;

303 nm, moléculas con cuatro dobles enlaces conjugados, entre las cuales se encuentran compuestos de oxidación secundaria procedentes de la oxidación de AGPI con tres o más insaturaciones.

Según esto la K_{232} es un buen marcador para la oxidación primaria y la K_{270} y K_{303} lo son para la oxidación secundaria.

No obstante, cabe destacar que esta poco estudiado como influye la oxidación de los AGPI con más de tres insaturaciones sobre los valores de las extinciones específicas a estas tres longitudes de onda.

3.4.1.METODOLOGÍA ANALÍTICA.

3.4.1.1.EXTRACCIÓN DE LA GRASA.

La extracción se realizó mediante el protocolo descrito a continuación, basado en el método de Folch *et al.* (1957). Se pesaron exactamente unos 0.80 g de huevo en polvo (5.4 g en el caso del huevo congelado) en un Erlenmeyer de 25 ml de capacidad y sobre ellos se añadieron 15 ml de la mezcla cloroformo/metanol (2:1, v/v). El conjunto se sometió a agitación magnética durante 30 minutos. A continuación, se decantó el líquido sobre un embudo con papel de filtro, recogiénose el filtrado sobre un tubo con tapon de rosca y junta de teflón (26 x 100). Tras ello, el residuo presente en el erlenmyer se reextrajo con 10 ml de cloroformo/metanol (2:1, v/v) durante 10 minutos (15 ml durante 20 minutos en el caso del huevo congelado). A continuación se filtró la mezcla y se lavó el Erlenmeyer y el residuo del papel de filtro con 5 ml más de la mezcla de disolventes. Estas dos últimas fracciones de filtrado se recogieron sobre el mismo tubo que la anterior y sobre ellas se añadieron 5 ml de agua destilada. El tubo se tapó, se agitó y se centrifugó a 2200 rpm durante 20 minutos. La fase inferior clorofórmica se filtró sobre sulfato sódico anhidro y el filtrado se recogió sobre un matraz de fondo redondo. El sulfato sódico del embudo se lavo con 5 porciones de 3 ml de cloroformo, que también se recogieron sobre el matraz de fondo redondo. Se

concentó el extracto hasta aproximadamente 1 ml mediante un evaporador rotatorio de vacío, a una temperatura de 35 °C. Las últimas fracciones de disolvente se eliminaron mediante corriente de nitrógeno y a continuación en un desecador con aplicación de vacío creciente. Después de toda una noche en el desecador, con un vacío de 750 mm Hg, se obtuvo la grasa sin disolvente y sin agua.

3.4.1.2.DETERMINACIÓN.

Fueron determinadas las absorbancias a 232, 270 y 303 nm siguiendo el método propuesto por Wolff (1968). Se pesaron exactamente, en un matraz aforado de 10 ml, unos 40 mg de grasa procedente del huevo en polvo (unos 60 mg en el caso del huevo congelado), se enrasó con ciclohexano UV, observando que la disolución fuese total, y se procedió a realizar la lectura a dichas longitudes de onda, utilizando como blanco el mismo disolvente. Se obtuvieron 3 valores de absorbancia a partir de los cuales se calcularon los coeficientes de extinción específica, para cada una de las longitudes de onda (K_{232} , K_{270} y K_{303}), según la fórmula:

$$K = E_{1\text{cm}}^{1\%} = \frac{A}{C \cdot e}$$

$K = E_{1\text{cm}}^{1\%}$ = extinción específica a la longitud de onda;

A = absorbancia leída para la longitud de onda;

C = concentración de la disolución de grasa en ciclohexano, expresada en g/100ml;

e = espesor de la cubeta en cm.

En esta determinación los valores de absorbancia tomados siempre estuvieron comprendidos entre 0.2 y 0.8; en los casos en que no fue así se realizaron diluciones hasta que la lectura cayó dentro de estos límites. Para la lectura a 232 nm siempre fue necesario realizar una dilución 3/10 de la solución inicial. La determinación de estas extinciones específicas se realizó por triplicado.

3.4.2.RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

En la tablas 4 5 y 6 se recogen los resultados obtenidos para las tres extinciones específicas en las diferentes muestras analizadas, así como el incremento que se produce para estas extinciones específicas durante la obtención de huevo en polvo a las diferentes condiciones de temperatura ensayadas. Los valores de este incremento constituyen una nueva variable para cada una de las extinciones específicas. Según esto, tenemos tres nuevas variables, cada una de las cuales refleja el aumento de una de las tres extinciones específicas durante el proceso de atomización. Los nombres de estas variables son:

$$\Delta K_{232} = K_{232} \text{ en huevo en polvo} - K_{232} \text{ en el correspondiente huevo congelado de partida.}$$

$$\Delta K_{270} = K_{270} \text{ en huevo en polvo} - K_{270} \text{ en el correspondiente huevo congelado de partida.}$$

$$\Delta K_{303} = K_{303} \text{ en huevo en polvo} - K_{303} \text{ en el correspondiente huevo congelado de partida.}$$

Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado.

Tabla 4-K₂₃₂ de las muestras de huevo en polvo y su incremento respecto a los valores de estas extinciones específicas en el huevo congelado de partida.

Muestra ^a	K _{232HP} ^b	K _{232A} ^c	Δ K _{232A} ^d	K _{232B} ^c	Δ K _{232B} ^d	K _{232C} ^c	Δ K _{232C} ^d
1	5.31	5.77	0.45	5.64	0.33	5.80	0.49
2	4.02	7.93	3.91	5.89	1.87	8.02	4.00
3	4.01	9.59	5.58	9.60	5.58	9.36	5.35
4	3.98	5.87	1.88	4.44	0.46	5.89	1.91
5	4.00	5.07	1.07	4.71	0.71	4.54	0.53
$\bar{X} =$	4.26	6.85	2.58	6.04	1.78	6.72	2.46

^a Muestra de huevo congelado de partida.

^b K_{232HP} = extinción específica a 232 nm para las muestras de huevo congelado de partida.

^c K_{232A} = extinción específica a 232 nm para las muestras huevo en polvo producidas en condiciones T_A, K_{232B} = extinción específica a 232 para las muestras huevo en polvo producidas en condiciones T_B y K_{232C} = extinción específica a 232 para las muestras huevo en polvo producidas en condiciones T_C.

^d Δ K_{232A} = K_{232A} - K_{232HP}, Δ K_{232B} = K_{232B} - K_{232HP} y Δ K_{232C} = K_{232C} - K_{232HP}

En la tabla 4 podemos observar que el valor medio de la variable ΔK_{232} varia en función de las condiciones de atomización, pero estas diferencias no son estadísticamente significativas (Análisis de la variancia para medidas repetidas, $\alpha = 0.05$)

Tabla 5- K_{270} de las muestras de huevo en polvo y su incremento respecto a los valores de estas extinciones específicas en el huevo congelado de partida.

Muestra ^a	K_{270HP} ^b	K_{270A} ^c	ΔK_{270A} ^d	K_{270B} ^c	ΔK_{270B} ^d	K_{270C} ^c	ΔK_{270C} ^d
1	0.67	0.82	0.16	0.86	0.19	0.83	0.16
2	0.42	1.18	0.76	1.09	0.67	1.60	1.17
3	0.42	1.67	1.25	1.77	1.35	1.92	1.50
4	0.41	0.90	0.49	0.94	0.53	0.87	0.46
5	0.42	1.20	0.78	1.16	0.75	1.06	0.64
\bar{X}	0.47	1.16	0.69	1.17	0.70	1.26	0.79

^a Muestra de huevo congelado de partida.

^b K_{270HP} = extinción específica a 270 nm para las muestras de huevo congelado de partida.

^c K_{270A} = extinción específica a 270 nm para las muestras huevo en polvo producidas en condiciones T_A , K_{270B} = extinción específica a 270 para las muestras huevo en polvo producidas en condiciones T_B y K_{270C} = extinción específica a 270 para las muestras huevo en polvo producidas en condiciones T_C .

^d $\Delta K_{270A} = K_{270A} - K_{270HP}$, $\Delta K_{270B} = K_{270B} - K_{270HP}$ y $\Delta K_{270C} = K_{270C} - K_{270HP}$

En la tabla 5 se observa que el valor medio de la variable ΔK_{270} aumenta a medida que aumenta la temperatura de atomización. No obstante, con un análisis de la variancia para medidas repetidas, se observó que las diferencias para esta variable en función de las condiciones de atomización no eran estadísticamente significativas.

Tabla 6- K_{303} de las muestras de huevo en polvo y su incremento respecto a los valores de estas extinciones específicas en el huevo congelado de partida.

Muestra ^a	K_{303HP} ^b	K_{303A} ^c	ΔK_{303A} ^d	K_{303B} ^c	ΔK_{303B} ^d	K_{303C} ^c	ΔK_{303C} ^d
1	0.20	0.32	0.13	0.33	0.13	0.33	0.13
2	0.13	0.56	0.42	0.54	0.41	1.01	0.88
3	0.13	0.88	0.75	1.01	0.88	1.16	1.03
4	0.13	0.40	0.27	0.47	0.35	0.34	0.22
5	0.13	0.64	0.51	0.59	0.46	0.42	0.29
\bar{X}	0.13	0.55	0.42	0.58	0.45	0.64	0.51

^a Muestra de huevo congelado de partida.

^b K_{303HP} = extinción específica a 303 nm para las muestras de huevo congelado de partida.

^c K_{303A} = extinción específica a 303 nm para las muestras huevo en polvo producidas en condiciones T_A , K_{303B} = extinción específica a 303 para las muestras huevo en polvo producidas en condiciones T_B y K_{303C} = extinción específica a 303 para las muestras huevo en polvo producidas en condiciones T_C .

^d $\Delta K_{303A} = K_{303A} - K_{303HP}$, $\Delta K_{303B} = K_{303B} - K_{303HP}$ y $\Delta K_{303C} = K_{303C} - K_{303HP}$

En la tabla 6 se puede observar que el valor medio de la variable ΔK_{303} presenta valores mayores a medida que aumenta la temperatura de atomización. Para saber si estas diferencias en función de la temperatura de atomización eran estadísticamente significativas, se aplicó un análisis de la variancia para medidas repetidas, el cual señaló que no lo eran.

3.5.DETERMINACIÓN DEL COLOR.

El color en la yema de huevo viene dado por los carotenoides. Estos compuestos forman uno de los más importantes grupos de pigmentos naturales, presentándose tanto en el reino animal como vegetal. No obstante, a diferencia de los vegetales, los animales no son capaces de sintetizar estos moléculas. Los carotenoides se caracterizan por presentar en su estructura un sistema de dobles enlaces conjugados. Estos compuestos se dividen en cuatro grupos: los carotenos (estructuras hidrocarbonadas con 40 átomos de carbono), las xantofilas (poseen la

misma estructura que los carotenos pero con una o varias funciones que contienen oxígeno), los apo-carotenoides (estructuras con menos de 40 átomos de carbono) y los carotenoides con más de 40 átomos de carbono. Solamente algunos de estos compuestos pueden generar vitamina A por partición de la molécula, concretamente los que poseen una de sus mitades idéntica a la del β -caroteno.

Entre los carotenoides presentes en la yema de huevo se encuentran el β -caroteno, en pequeñas cantidades, algunos apo-carotenoides y algunas xantofilas. Los apo-carotenoides presentes son, básicamente, β -apo-8'-carotenaldehído y ácido β -apo-8'-carotenoico. Entre las xantofilas se encuentran la zeaxantina, la luteína, la criptoxantina, la astaxantina y la cantaxantina, siendo mayoritarias las dos primeras (Baldwin, 1977; Burley y Vadehra, 1989).

En general, la alteración de los carotenoides se puede producir mediante los tres siguientes mecanismos (Simpson, 1985):

Isomerización *cis-trans*: la configuración más estable de los carotenoides es la forma *todo-trans* y así es como se encuentran, generalmente, en la naturaleza. A elevadas temperaturas y, especialmente, en presencia de luz, I_2 o sobretodo ácidos se forman isómeros *cis* de estos compuestos. Desde un punto de vista nutricional, las consecuencias de esta alteración son claras, ya que los isómeros *cis* tienen una menor actividad provitamínica A que los correspondientes *todo-trans*. La isomerización de un doble enlace en un carotenoide *todo-trans* conduce a un desplazamiento de su máximo de absorción hacia longitudes de onda más cortas. El desplazamiento es de 2 a 5 nm. Este proceso tiene especial incidencia en las frutas enlatadas en medio ácido.

Epoxidación: es un proceso que en la mayoría de ocasiones se produce por mecanismos enzimáticos y que siempre conduce a cambios en la coloración. Los epoxicarotenoides se han hallado básicamente en productos de origen vegetal.

Cambios oxidativos: los carotenoides poseen en su estructura un sistema de dobles enlaces conjugados, lo que les hace especialmente sensibles a la oxidación, proceso que conduce a una pérdida de color. Según esto, esta alteración de los carotenoides provoca una disminución

de la calidad sensorial del producto, pero, por otro lado, también implica una disminución de su potencial provitamínico A.

La oxidación de los pigmentos carotenoides en alimentos está, por norma general, asociada a la de los ácidos grasos insaturados y suele ser autocatalítica. La reacción puede ser o no enzimática, pero siempre está directamente relacionada con la actividad del agua (a_w), temperatura y la presencia de O_2 y de ciertos metales.

La oxidación no enzimática de los carotenoides es un proceso autoxidativo de tipo radicalario idéntico al que siguen los AG, presenta una fase de iniciación, otra de propagación y una última de finalización.

Esta autoxidación es particularmente importante durante los procesos de deshidratación, en donde está muy condicionada por la a_w . Numerosos autores han postulado la existencia de un valor crítico de a_w por debajo del cual la oxidación se ve favorecida

Según todo esto, de estos tres procesos de alteración, durante la atomización tiene lugar esencialmente el último de ellos. Para evaluar la alteración de los carotenoides durante la atomización, se utilizó un método espectrofotométrico, basado en el método oficial de la AOAC (958.05, 1990). Con este método se midió el color en los huevos congelados y en sus muestras correspondientes de huevo en polvo. La diferencia entre estas dos mediciones se atribuyó a la degradación de los carotenoides durante el proceso de atomización. De esta manera, con este método, se evalúa la alteración global de los carotenoides. Una forma más específica de valorar la descomposición de los carotenoides sería la identificación y cuantificación de sus productos de degradación. El protocolo del método utilizado para la determinación del color en el huevo se detalla a continuación.

3.5.1. METODOLOGÍA ANALÍTICA.

Preparación de las soluciones patrón de β -caroteno y obtención de la correspondiente recta de calibrado: a partir de una solución madre de 6 μg de β -caroteno/ml (aproximadamente 1.5 mg de caroteno, pesados en una microbalanza que apreciaba hasta la

centésima de mg y disueltos en acetona hasta un volumen de 250 ml) se realizaron las siguientes diluciones: 10/100, 20/100, 30/100, 45/100 y de esta última dilución una segunda dilución 1/10, que correspondió al primer punto de la recta de calibrado. Se determinaron las absorbancias de estas soluciones a 440 nm, tan pronto como fue posible, teniendo en cuenta que los valores de absorbancia deben estar comprendidos entre 0.0458 y 1.0000, tal como recomienda la AOAC. Se realizaron 5 lecturas de cada una de las diluciones.

En la tabla 7 figuran los resultados correspondientes a la primera de las rectas de calibrado, de las que se han realizado a lo largo de este trabajo.

Tabla 7-Recta de calibrado.

$\mu\text{g } \beta\text{-caroteno/ml (x)}$	Absorbancia a 440 nm (y)				
0.27	0.064	0.061	0.061	0.063	0.055
0.61	0.136	0.136	0.135	0.135	0.127
1.21	0.303	0.283	0.283	0.283	0.270
1.82	0.408	0.409	0.410	0.412	0.399
2.72	0.611	0.612	0.615	0.615	0.601
Ecuación de la recta: $y = 0.2244 x + 0.0021$					

Determinación del color en las muestras: para realizar las diferentes determinaciones se pesaron a precisión unos 3.6 g de huevo congelado o 1.4 g de huevo en polvo, en un vaso de precipitados de 50 ml de capacidad. Sobre la muestra se añadieron 2.5 ml de acetona, con lo que se hizo una pasta homogénea utilizando una varilla y, a continuación, se añadió un núcleo magnético y otros 20 ml más de acetona. La mezcla se sometió a agitación magnética durante 5 minutos. Posteriormente, se filtró sobre papel Whatman nº 4, recogiendo el filtrado en un matraz aforado de 25 ml. El paso fue cuantitativo, lavando el vaso de precipitados con tres fracciones de 1 ml de acetona y el residuo del embudo con 2 fracciones más de 1 ml. Se enrasó el matraz aforado y se procedió a leer la absorbancia a 440 nm. Los resultados se expresaron en $\mu\text{g } \beta\text{-caroteno}$ por g de materia seca.

3.5.2.PRECISIÓN DEL MÉTODO.

Para conocer la precisión intralaboratorio de este método se realizaron 10 determinaciones sobre una misma muestra de huevo en polvo. Los análisis los realizó un único analista, en el mismo laboratorio, en días sucesivos y empleando el mismo material y reactivos. En la tabla 8 figuran, expresados en $\mu\text{g } \beta\text{-caroteno/g}$ materia seca, los valores obtenidos en cada una de las 10 determinaciones, así como su media y su coeficiente de variación. En esta tabla se puede apreciar que se trata de un método bastante preciso ($\text{CV} = 1.97$).

Tabla 8-precisión del método espectrofotométrico para la determinación del color.

Repetición	$\mu\text{g } \beta\text{-caroteno/g}$ materia seca
1	15.58
2	15.03
3	14.31
4	15.47
5	14.54
6	14.91
7	14.98
8	15.05
9	14.95
10	15.01
$\bar{X} =$	15.08
$\text{CV} (\%)^a =$	1.97

^a Coeficiente de variación en tanto por ciento.

3.5.3.RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

En la tabla 9 se recogen los resultados obtenidos en la determinación del color, para las muestras de huevo en polvo y las correspondientes de huevo congelado de partida, expresados en μg de β -caroteno/g de materia seca. Todas las determinaciones fueron realizadas por duplicado. En esta tabla, también se recogen los valores de la variable pérdida de color, resultantes de restarle al color de la muestra de huevo congelado de partida el color de las correspondientes muestras de huevo en polvo. Esta variable refleja la pérdida de color durante el proceso de atomización del huevo.

Tabla 9-Color de las muestras de huevo en polvo y pérdida de color respecto a las muestras de partida (μg β -caroteno/g de materia seca).

Muestra ^b	C_{HP}^c	T_A^a		T_B^a		T_C^a	
		C_A^c	PC_A^d	C_B^c	PC_B^d	C_C^c	PC_C^d
1	27.80	15.25	12.55	14.27	13.53	14.98	12.82
2	29.83	15.61	14.22	13.64	16.20	10.10	19.73
3	30.19	11.49	18.70	10.60	19.59	7.43	22.76
4	29.63	14.91	14.72	14.22	15.41	8.85	20.78
5	27.40	10.22	17.17	9.49	17.91	11.47	15.94
$\bar{X} =$	28.97	13.50	<i>15.47</i>	12.49	16.53	10.56	18.41

^a T = temperaturas de atomización (temperatura de entrada-salida): T_A (180°C-120°C), T_B (193°C-128°C) y T_C (231°C-142°C).

^b Muestra de huevo congelado de partida.

^c C_{HP} = color huevo de partida, C_A = color huevo en polvo producido en condiciones T_A , C_B = color huevo en polvo producido en condiciones T_B y C_C = color huevo en polvo producido en condiciones T_C .

^d PC = pérdida de color, $PC_A = C_{\text{HP}} - C_A$, $PC_B = C_{\text{HP}} - C_B$ y $PC_C = C_{\text{HP}} - C_C$

En la tabla 9, vemos que el valor medio de la variable pérdida de color presenta valores mayores a medida que aumenta la temperatura de atomización. Para saber si estas diferencias

en función de la temperatura de atomización eran estadísticamente significativas, se aplicó un análisis de la variancia para medidas repetidas, el cual señaló que no lo eran.

3.6.DETERMINACIÓN DE LA INTENSIDAD DE PARDEAMIENTO PRODUCIDO POR LA REACCIÓN DE MAILLARD.

La reacción de Maillard constituye un proceso no enzimático, favorecido por valores intermedios de a_w y valores elevados de pH y temperatura, que en su etapa final da lugar a polímeros de color parduzco llamados mealanoídnas. Esta reacción se inicia, usualmente, por la condensación entre el grupo carbonilo de un azúcar reductor (aldosa o cetosa) y el grupo amino libre de un aminoácido, péptido o proteína. Se ha demostrado que, en algunas ocasiones, el grupo carbonilo puede venir proporcionado por productos de oxidación lipídica, este hecho es particularmente importante en el huevo en polvo, donde la oxidación lipídica alcanza rápidamente su fase secundaria con la consecuente formación de compuestos carbonílicos. En relación con el inicio de la reacción, resulta interesante señalar que entre los componentes del huevo se encuentran pequeñas cantidades de glucosa, azúcar reductor perteneciente al grupo de las hexosas. Las hexosas aunque son menos reactivas que las pentosas son capaces de desencadenar la reacción de Maillard. Por otra parte, el huevo en la composición de sus proteínas presenta cantidades considerables de lisina, arginina e histidina, que aminoácidos básicos, los cuales aun ligados a proteínas o péptidos siempre presentan, como mínimo, un grupo amino libre reactivo. Se ha comprobado que en un hidrolizado de clara de huevo mezclado con glucosa, estos tres aminoácidos son los más afectados por la reacción de Maillard (Chichester y Lee, 1981). Además, en el caso de los ovoproductos en polvo el tratamiento térmico necesario para su obtención favorece el inicio y desarrollo de la reacción de Maillard. Según todo esto, el huevo en polvo es un sustrato que presenta una cierta idoneidad para que tenga lugar la reacción de Maillard y de hecho esta reacción supone un problema durante la producción y almacenamiento de ovoproductos, ya que da lugar a cambios de color y "flavor" que influyen en la aceptación del producto. Para resolver este problema se han desarrollado diferentes sistemas de fermentación para eliminar la glucosa de forma previa a la deshidratación. Estos sistemas constituyen un paso ineludible en la fabricación de albúmina de huevo en polvo, ya que la clara contiene la mayor parte de glucosa del huevo y el cambio de color producido por la reacción de Maillard en este producto es especialmente evidente.

En nuestro trabajo se observó una coloración parduzca creciente en función de la temperatura de atomización a la que se habían obtenido las muestras de huevo en polvo. Esta observación fue un claro indicio de que la reacción de Maillard tenía lugar durante la atomización, por lo cual nos palteamos medir el alcance de esta reacción. Esta medición se puede realizar, según diferentes métodos, pero los más importantes son:

- por fluorescencia (excitación 350 nm y emisión 410 nm);
- por espectrometría fotoacústica (280 y 335 nm);
- por espectrometría UV (250-300 nm);
- por CG (cuantificación de la furosina o 5-hidroximetilfurfural);
- por CLAE (cuantificación de la furosina o otros productos de reacción);
- por cromatografía de intercambio iónico (cuantificación de la furosina);
- espectrometría visible (420 nm).

De todos estos métodos en nuestro estudio se eligió el último, por ser unos de los más utilizados según la bibliografía consultada (Akhavan y Wrolstad, 1980; Ashoor y Zent, 1984; Cornwell y Wrolstad, 1981; Gazzani y Cuzzoni, 1984; Reyes *et al.*, 1982; Tanaka *et al.*, 1986; Toribio y Lozano, 1984; Tsai *et al.*, 1991) y, al mismo tiempo, uno de los más sencillos y rápidos. Este método no requiere, casi, preparación de la muestra; simplemente es necesario, a grandes rasgos, mezclar la muestra en agua destilada, filtrar y medir su absorbancia directamente a 420 nm. En algunas muestras, sin embargo, es necesario eliminar las proteínas, para lo que se suele utilizar ácido tricloroacético al 10% como agente defecante. Con este método se mide la intensidad de pardeamiento que es producto de la presencia de melanoidinas. Los compuestos que se forman durante la caramelización también presentan absorción a 420 nm, con lo cual este método no es selectivo; no obstante, este hecho es prácticamente irrelevante ya que la caramelización en el huevo no puede ser muy extensa, debido a los bajos niveles de azúcares que presenta.

A continuación, se describe el protocolo seguido en nuestro estudio para la determinación de la intensidad de pardeamiento producido por la reacción de Maillard (Tsai *et al.*, 1991).

3.6.1.METODOLOGÍA ANALÍTICA.

0.8 g de muestra fueron homogeneizados, mediante agitación magnética durante 10 minutos, con 10 ml de ácido tricloroacético al 10% y, a continuación, filtrados a través de un papel Whatman n° 42. El filtrado fue recogido en un matraz aforado de 10 ml, se lavó sucesivamente el residuo del papel de filtro con pequeñas porciones de ácido tricloroacético que también fueron recogidas y se enrasó. Finalmente, se midió la absorbancia de esta solución a 420nm utilizando la solución de ácido tricloroacético al 10 % como blanco.

3.6.2.PRECISIÓN DEL MÉTODO.

Para conocer la precisión intralaboratorio de este método se realizaron 10 determinaciones sobre una misma muestra de huevo en polvo, producida en condiciones T_B y procedente de la muestra 4 de huevo congelado. Los análisis los realizó un único analista, en el mismo laboratorio, en días sucesivos y empleando el mismo material y reactivos. En la tabla 10 figuran, expresados en absorbancia a 420 nm por g materia seca, los valores obtenidos en cada una de las 10 determinaciones, así como su media y su coeficiente de variación. En esta tabla se puede observar que se trata de un método muy preciso.

Tabla 10-Precisión del método del método espectrofotométrico para medir la intensidad de pardeamiento debida a la reacción de Maillard.

Repetición	absorbancia 420nm/g materia seca
1	0.028
2	0.027
3	0.027
4	0.026
5	0.026
6	0.026
7	0.026
8	0.026
9	0.026
10	0.026
$\bar{X} =$	0.026
CV(%) ^a =	2.4

^a Coeficiente de variación en tanto por ciento.

3.6.3.RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

En la tabla 11 se recogen los resultados obtenidos en la determinación de la intensidad de pardeamiento, producido por la reacción de Maillard, para las muestras de huevo en polvo, obtenidas por atomización, a las tres condiciones diferentes de temperatura (T_A , T_B y T_C). Los resultados vienen expresados como absorbancia a 420 nm/g de materia seca. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado. En los resultados de la tabla podemos observar un ligero aumento de la intensidad de pardeamiento en función de la temperatura de atomización empleada.

Tabla 11-Intensidad de pardeamiento debido a la reacción de Maillard, en las muestras de huevo en polvo obtenidas en las tres condiciones diferentes de temperatura.

Muestra ^a	Absorbancia a 420 nm/g de materia seca		
	T _A ^b	T _B ^b	T _C ^b
1	0.025	0.028	0.033
2	0.024	0.033	0.051
3	0.040	0.050	0.070
4	0.026	0.026	0.027
5	0.032	0.033	0.032
\bar{X}	0.029	0.034	0.043

^a Muestra de huevo congelado de partida.

^b T = temperaturas de atomización (temperatura de entrada-salida): T_A (180°-120°), T_B (193°-128°), T_C (231°-142°).

En la tabla 11 se observa que el valor medio de la intensidad de pardeamiento, aumenta con la temperatura de atomización. Para saber si estas diferencias en función de la temperatura de atomización eran estadísticamente significativas, se aplicó un análisis de la variancia para medidas repetidas, el cual señaló que no lo eran.

3.7.DETERMINACIÓN DE LOS OXIESTEROLES.

Esta determinación se realizó por duplicado siguiendo el método 3, que ha sido descrito anteriormente en el apartado IV.B.2.5. (páginas 234-242). En este caso se partió de 0.65 g de huevo en polvo o de 4 de huevo congelado, los tiempos de agitación magnética aplicados para la extracción de la grasa fueron los descritos en la tabla 1 del apartado IV.A.1. (página 157). La determinación cromatográfica se realizó en el cromatógrafo Perkin-Elmer modelo Autosystem y se utilizó el 19-HC como patrón interno.

3.7.1.RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

3.7.1.1.FORMACIÓN DE OXIESTEROLES EN EL HUEVO EN POLVO: EFECTO DE LA TEMPERATURA DE ATOMIZACIÓN.

Como ya ha sido mencionado anteriormente, la atomización y la forma en que se realiza son aspectos cruciales en la formación de OE. También ha sido comentado con anterioridad, que uno de los parámetros más determinantes, de esta operación, es el sistema de calefacción. Este sistema puede ser directo o indirecto. Diversos autores han observado que la formación de OE en atomizadores con fuente de calor indirecta es de pequeña importancia en relación con la formación de estos compuestos en atomizadores con fuente de calor directa.

En nuestro estudio, a pesar de ser realizado en un atomizador con fuente de calor indirecta, la aplicación de análisis de la variancia para medidas repetidas, entre los grupos huevo congelado, huevo en polvo obtenido a las condiciones T_A , huevo en polvo obtenido a las condiciones T_B y huevo en polvo obtenido a las condiciones T_C , puso de manifiesto la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los contenidos medios de estos grupos para los diferentes oxiesteroles estudiados (α -CE, $P < 0.0001$; 7β -HC, $P < 0.0001$; CT, $P < 0.0001$; 7-CC, $P < 0.0001$; 25-HC, $P < 0.0001$; y OE totales, $P < 0.0001$). La posterior aplicación de contrastes de hipótesis a "priori" para medidas repetidas mostró la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los contenidos medios de los diferentes oxiesteroles en huevo congelado y los contenidos medios de estos oxiesteroles en cada uno de los tres huevos en polvo obtenidos a las diferentes temperaturas de atomización. Los contenidos medios de oxiesteroles figuran en la tabla 12, mientras que los grados de significación y los intervalos de confianza de los contrastes a "priori" para medidas repetidas aparecen en la tabla 13.

Tabla 12-Contenidos medios de oxiesteroles (n=6), en ppm sobre materia seca, para el huevo congelado y para los tres huevos en polvo obtenidos a las tres temperaturas de atomización (T_A , T_B y T_C).

Oxiesteroles	Huevo	Huevos en polvo		
	congelado	T_A^a	T_B^a	T_C^a
α -CE ^b	0.76	7.60	8.56	10.71
7 β -HC	0.88	11.28	13.01	17.39
CT	4.10	7.13	7.89	8.76
7-CC	3.95	23.66	22.97	30.58
25-HC	0.65	1.19	1.21	1.47
OE TOTALES	10.33	50.85	53.64	68.91

^a T = temperaturas de atomización (temperatura de entrada-salida): T_A (180°C-120°C), T_B (193°C-128°C), T_C (231°C-142°C).

^b Símbolos: α -CE (5,6 α -epoxi-5 α -colestan-3 β -ol), 7 β -HC (colest-5-en-3 β ,7 β -diol), CT (5 α -colestan-3 β ,5,6 β -triol), 7-CC (3 β -hidroxicolest-5-en-7-ona), 25-HC (colest-5-en-3 β ,25-diol).

En la Figura 4 se muestran, comparativamente, los contenidos medios de los OE estudiados en el huevo congelado de partida y en los tres huevos en polvo, obtenidos a partir del mismo, a las diferentes condiciones de atomización ensayadas (T_A , T_B y T_C).

Tabla 13-Grados de significación e intervalos de confianza (95%) de los contrastes a "priori" (medidas repetidas)

		Huevos en polvo		
Oxisteroles		T _A ^a	T _B ^a	T _C ^a
C	α-CE ^b	P = 0.0011 ^c 4.24÷9.44 ^d	P = 0.0009 4.97÷10.63	P = 0.0032 5.12÷14.79
	7β-HC	P = 0.0003 7.46÷13.33	P = 0.0003 8.53÷15.63	P = 0.0008 10.69÷22.33
U G	CT	P = 0.0009 1.93÷4.15	P = 0.0002 2.80÷4.79	P = 0.0051 2.14÷7.18
V L	7-CC	P = 0.0001 15.70÷23.72	P < 0.0001 15.42÷22.62	P = 0.0012 16.20÷37.06
D	25-HC	P = 0.0006 3.61÷0.72	P = 0.0002 0.42÷0.72	P = 0.0011 0.51÷1.14
O	OE TOTALES	P = 0.0001 30.40÷50.65	P = 0.0001 32.59÷53.74	P = 0.0007 38.40÷78.77

^a T = temperaturas de atomización (temperatura de entrada-salida): T_A (180°C-120°C), T_B (193°C-128°C), T_C (231°C-142°C).

^b Símbolos: α-CE (5,6α-epoxi-5α-colestan-3β-ol), 7β-HC (colest-5-en-3β,7β-diol), CT (5α-colestan-3β,5,6β-triol), 7-CC (3β-hidroxicolest-5-en-7-ona), 25-HC (colest-5-en-3β,25-diol).

^c P = Grado de significación.

^d Intervalo de confianza (95%).

De la tabla 13 podemos concluir que los niveles de OE en los huevos en polvo obtenidos a las diferentes temperaturas de atomización son claramente superiores a los del huevo congelado.

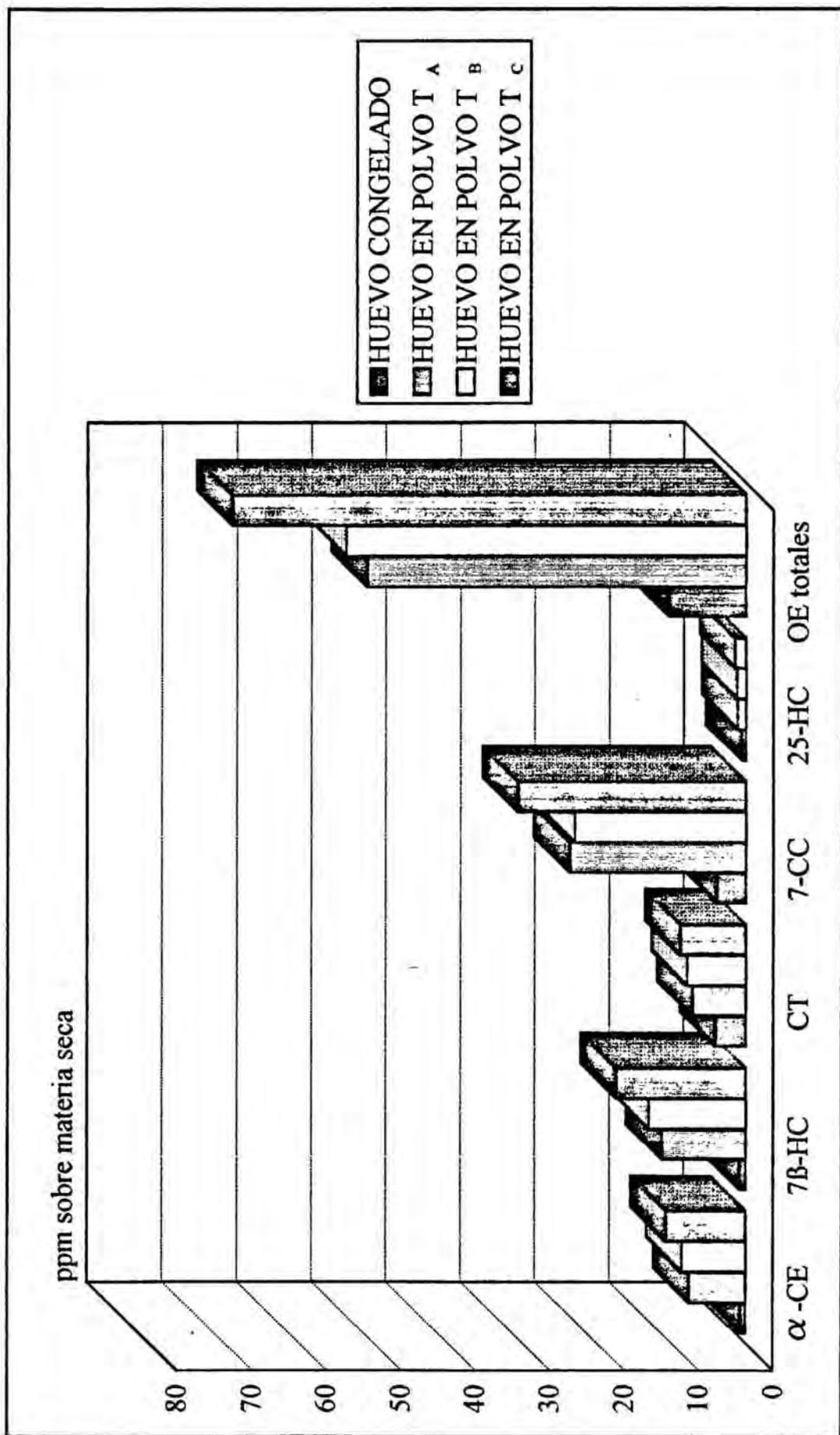


Figura 4-Contenidos medios de OE, en ppm sobre materia seca, en el huevo congelado de partida y en los tres huevos en polvo obtenidos a partir de él.

Por otro lado, y con el fin de estudiar las posibles diferencias entre la formación de oxiesteroles a las diferentes temperaturas de atomización, se definió la variable "Formación de oxiesterol" resultante de la sustracción del contenido de oxiesterol en huevo congelado de partida del contenido de oxiesterol en el correspondiente huevo en polvo. Los valores medios de esta variable para los diferentes oxiesteroles y para el total de oxiesteroles, a las diferentes temperaturas de atomización aparecen en la tabla 14 y se representan gráficamente en la figura 5. El análisis de la variancia (medidas repetidas) aplicado a esta variable resultó en diferencias estadísticamente significativas para el α -CE ($P = 0.0242$), 7 β -HC ($P = 0.0081$), 25-HC ($P = 0.0244$) y OE totales ($P = 0.0161$), entre las diferentes temperaturas de atomización utilizadas. Para el 7-CC se encontraron diferencias casi significativas ($P = 0.0836$), en cambio no se encontraron diferencias significativas para el CT. Para los oxiesteroles en que se encontraron diferencias significativas y para los OE totales se aplicaron contrastes a "priori" con el fin de comprobar las siguientes hipótesis:

- que la media de la variable "Formación de oxiesterol" para las condiciones T_B ($n=6$) difería de la media de esta misma variable para las condiciones T_A ($n=6$), el contraste se expresa como $\mu_A - \mu_B$;
- que la media de la variable "Formación de oxiesterol" para las condiciones T_C difería de la media de esta variable para las condiciones T_A , el contraste se expresa como $\mu_A - \mu_C$;
- que la media de la variable "Formación de oxiesterol" para las condiciones T_C difería de la media de esta variable para las condiciones T_B , el contraste se expresa como $\mu_B - \mu_C$;
- que la media de la variable "Formación de oxiesterol" para las condiciones T_C difería de la media de esta variable para las condiciones T_A y T_B , el contraste se expresa como $[(\mu_A + \mu_B)/2] - \mu_C$.

Los grados de significación de estos contrastes y sus intervalos de confianza se encuentran en la tabla 15. Según estos contrastes se puede concluir que:

- la formación de oxiesteroles en condiciones T_B no es significativamente superior a la formación de estos compuestos en condiciones T_A ;
- la formación de oxiesteroles en condiciones T_C es significativamente superior a la formación de estos compuestos en condiciones T_A para α -CE, 7 β -HC, 25-HC y OE totales;

- la formación de oxiesteroles en condiciones T_C es significativamente superior a la formación de estos compuestos en condiciones T_B para 7 β -HC y OE totales;
- la formación de oxiesteroles en condiciones T_C es significativamente superior a la formación de estos compuestos en condiciones T_A y T_B para α -CE, 7 β -HC y OE totales, lo cual indica que las temperaturas bajas de atomización (T_A y T_B), en cierta forma, evitan la formación de OE y que posiblemente entre T_B y T_C existe una temperatura crítica a partir de la cual se dispara la formación de oxiesteroles. Según esto, en los atomizadores con fuente de calor indirecta, en donde se puede obtener un producto lo suficientemente seco trabajando con temperaturas bajas, es aconsejable operar a estas temperaturas.

Tabla 14-Valores medios (n=6) de la variable "Formación de oxiesterol" para los diferentes OE a las diferentes temperaturas de atomización

Oxiesteroles	"Formación de oxiesteroles"		
	T_A^a	T_B^a	T_C^a
α -CE ^b	6.84	7.80	9.96
7 β -HC	10.40	12.13	16.51
CT	3.03	3.79	4.66
7-CC	19.71	19.02	26.63
25-HC	0.54	0.57	0.83
OE TOTALES	40.52	43.31	58.58

^a T = temperaturas de atomización (temperatura de entrada-salida): T_A (180°C-120°C), T_B (193°C-128°C), T_C (231°C-142°C).

^b Símbolos: α -CE (5,6 α -epoxi-5 α -colestano-3 β -ol), 7 β -HC (colest-5-en-3 β ,7 β -diol), CT (5 α -colestano-3 β ,5,6 β -triol), 7-CC (3 β -hidroxicolest-5-en-7-ona), 25-HC (colest-5-en-3 β ,25-diols).

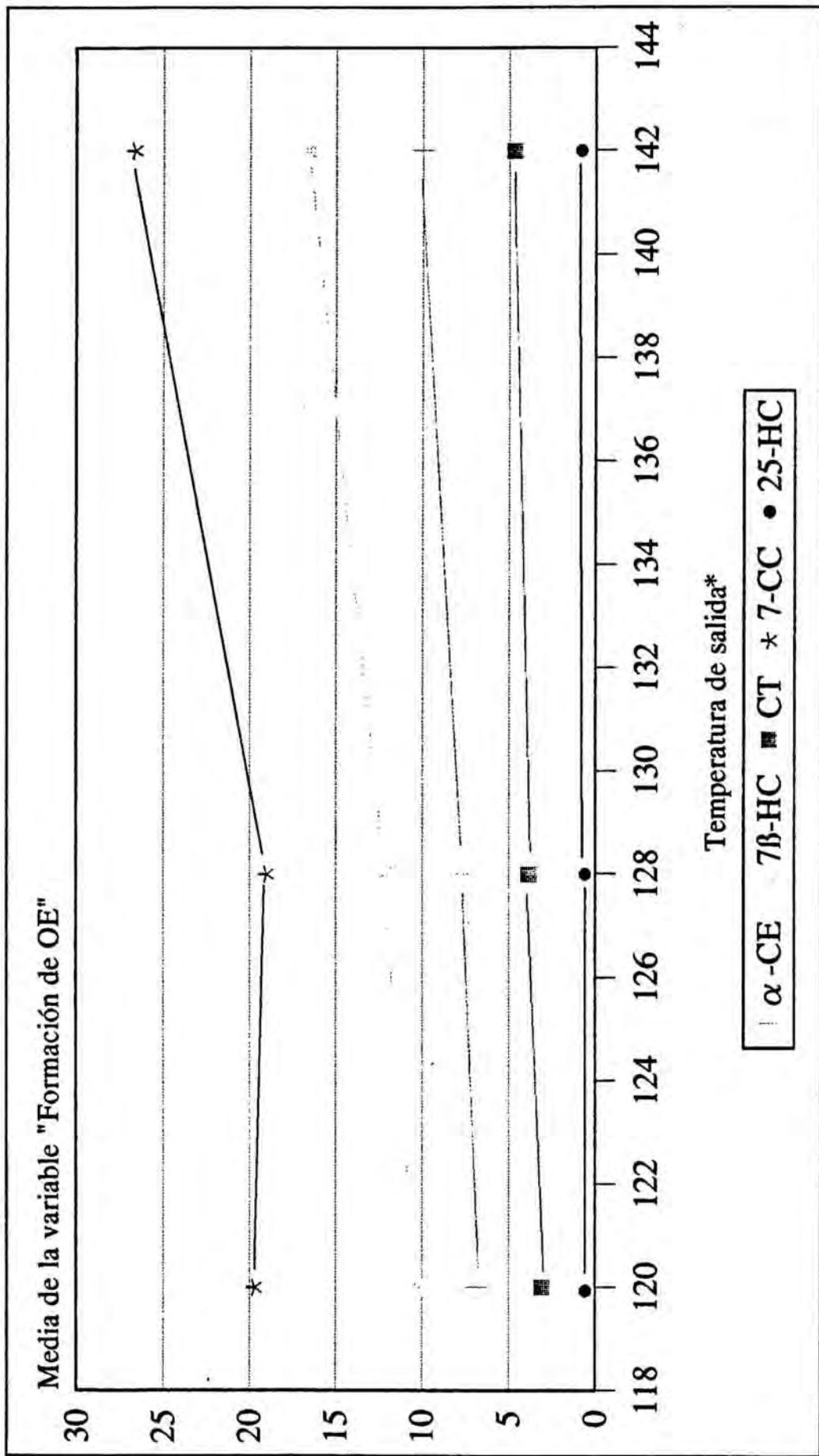


Figura 5- "Formación de OE" a diferentes temperaturas de atomización.

* La representación se realiza frente a la temperatura de salida ya que es la más representativa de la temperatura interior del atomizador.

Tabla 15-Niveles de significación e intervalos de confianza (95%) de los contrastes a "priori".

Oxisteroles	Contrastes (Φ)			
	$\mu_A - \mu_B^a$	$\mu_A - \mu_C^a$	$\mu_B - \mu_C^a$	$[(\mu_A + \mu_B)/2] - \mu_C^a$
α -CE	NS ^b	P = 0.0464 0.074 ÷ 6.156	CS ^c P = 0.0622	P = 0.0439 0.107 ÷ 5.165
7B-HC	NS	P = 0.0292 0.920 ÷ 11.309	P = 0.0334 0.512 ÷ 8.249	P = 0.0278 0.854 ÷ 9.641
25-HC	NS	P = 0.0457 0.008 ÷ 0.563	CS P = 0.0805	CS P = 0.0587
OE TOTALES	NS	P = 0.0473 0.314 ÷ 35.812	P = 0.0336 1.755 ÷ 28.790	P = 0.0362 1.593 ÷ 31.743

^a μ_A media de la variable "Formación de oxisterol" para las condiciones T_A (contenido de oxisterol en huevo en polvo obtenido bajo las condiciones T_A - contenido de oxisterol en el correspondiente huevo congelado de partida).

μ_B media de la variable "Formación de oxisterol" para las condiciones T_B (contenido de oxisterol en huevo en polvo obtenido bajo las condiciones T_B - contenido de oxisterol en el correspondiente huevo congelado de partida).

μ_C media de la variable "Formación de oxisterol" para las condiciones T_C (contenido de oxisterol en huevo en polvo obtenido bajo las condiciones T_C - contenido de oxisterol en el correspondiente huevo congelado de partida).

^b No significativo.

^c Casi significativo ($P \leq 0.10$).

3.7.1.2. ESTUDIO DE LAS CORRELACIONES ENTRE LA FORMACIÓN DE OXISTEROLES EN HUEVO EN POLVO Y LOS DEMÁS PARÁMETROS DE CALIDAD EVALUADOS.

Algunos trabajos han correlacionado los niveles de OE con otros parámetros de oxidación de lípidos (De Vore, 1988; Zhang y Addis, 1990). En nuestro estudio hemos encontrado

relaciones lineales significativas entre la formación de OE durante la atomización y las siguientes variables (prueba de Spearman, $\alpha=0.05$):

- $\Delta K_{232} = K_{232}$ para el huevo en polvo - K_{232} para el correspondiente huevo congelado de partida;
- $\Delta K_{270} = K_{270}$ para el huevo en polvo - K_{270} para el correspondiente huevo congelado de partida;
- $\Delta K_{303} = K_{303}$ para el huevo en polvo - K_{303} para el correspondiente huevo congelado de partida;
- Pérdida de color (PC) = Intensidad de coloración a 440 nm (expresada como $\mu\text{g } \beta\text{-caroteno/g}$ materia seca) en huevo congelado de partida - Intensidad de coloración a 440 nm en el correspondiente huevo en polvo;
- Intensidad de pardeamiento de Maillard (IPM) en huevo en polvo expresada como absorbancia a 420 nm/g de materia seca.

Los valores de cada una de las variables utilizadas en este estudio de correlación figuran en la tabla 16.

En la tabla 17 figuran los coeficientes de correlación de Spearman y su grado de significación para las diferentes relaciones lineales encontradas.

En las figuras 6-10 se representan de las variables que hacen referencia a parámetros de calidad (ΔK_{232} , ΔK_{270} , ΔK_{303} , PC e IPM) y que están relacionadas linealmente con la variable "Formación total de oxiesteroles".

La conclusión que se puede sacar de todo esto es que se ha encontrado una relación lineal entre la formación de oxiesteroles durante el proceso de atomización y la evolución de otros parámetros de oxidación relacionados con la fracción lipídica, como son los coeficientes de extinción específica (K_{232} , K_{270} y K_{303}) y la pérdida de color asociada a la oxidación de los carotenoides. Esto nos ha permitido comprobar que la oxidación del colesterol sigue una vía paralela a los procesos generales de oxidación de la fracción lipídica, durante los tratamientos de atomización. Por otra parte, también se observa una correlación lineal entre la formación de oxiesteroles y el pardeamiento producido por reacción de Maillard, medido como absorbancia a 420 nm.

Tabla 16-Valores de las variables utilizadas en el estudio de correlación.

M ^a y T ^b	*Formación α-CE**	*Formación 7β-HC*	*Formación CT*	*Formación 7-Cc*	*Formación 25-HC*	*Formación total de OE*	ΔK ₃₂₂	ΔK ₂₇₀	ΔK ₃₀₃	PC	IPM	
1	T _A	6.54	9.62	2.59	18.63	0.47	37.84	0.45	0.16	0.13	12.55	0.025
	T _B	4.79	7.67	3.36	14.74	0.60	31.16	0.33	0.19	0.13	13.53	0.028
	T _C	6.22	10.46	2.73	15.54	0.50	35.43	0.49	0.16	0.13	12.82	0.033
2	T _A	4.83	8.02	4.15	16.94	0.37	34.30	3.92	0.76	0.42	14.22	0.024
	T _B	6.63	9.41	2.80	17.95	0.49	37.27	1.87	0.67	0.41	16.19	0.033
	T _C	8.85	16.83	2.76	39.41	0.50	68.34	4.00	1.17	0.88	19.73	0.051
3	T _A	1.17	15.65	4.28	27.19	0.75	59.60	5.58	1.25	0.75	18.70	0.040
	T _B	21.23	17.02	4.78	22.27	0.81	57.20	5.59	1.35	0.88	19.59	0.050
	T _C	21.86	24.68	9.11	31.07	1.26	84.74	5.35	1.50	1.03	22.76	0.070
4	T _A	5.86	9.97	2.10	20.02	0.34	38.30	1.88	0.49	0.27	14.72	0.026
	T _B	5.93	11.70	2.71	16.82	0.37	37.53	0.46	0.53	0.35	15.41	0.026
	T _C	6.97	14.86	5.37	19.08	1.05	47.32	1.91	0.46	0.22	20.78	0.027
5	T _A	6.66	10.90	3.34	18.20	0.65	39.66	1.07	0.78	0.51	17.18	0.032
	T _B	7.90	12.97	4.51	18.43	0.56	44.37	0.71	0.75	0.46	17.91	0.033
	T _C	7.74	11.26	4.41	19.30	0.87	43.57	0.54	0.64	0.29	15.94	0.032

* Muestra de huevo congelado de procedencia.

^b Temperaturas de atomización de los huevos en polvo (temperatura de entrada-salida): T_A (180°C-120°C), T_B (193°C-128°C) y T_C (231°C-142°C).

• Símbolos: α-CE (5,6α-epoxi-5α-colestan-3β-ol), 7β-HC (colest-5-en-3β,7β-diol), CT (5α-colestan-3β,5,6β-triol), 7-Cc (3β-hidroxicolest-5-en-7-ona), 25-HC (colest-5-en-3β,25-diol).

Tabla 17-Coeficientes de correlación de Spearman (r_s) y su grado de significación ($n = 15$).

"Formación α -CE"	"Formación 7 β -HC"	"Formación CT"	"Formación 7-CC"	"Formación 25-HC"	"Formación total de OE"	ΔK_{232}	ΔK_{270}	ΔK_{303}	PC	IPM	
1.0000 ^a	0.6751 P = 0.0139 ^b	0.4929 P = 0.0652	0.5179 P = 0.0527	0.5321 P = 0.0465	0.6500 P = 0.0150	0.3321 NS ^c	0.4393 NS	0.4893 P = 0.0671	0.6500 P = 0.0150	0.5666 P = 0.0340	"Formación α -CE"
1.0000	0.5393 P = 0.0436	0.7500 P = 0.0050	0.6036 P = 0.0239	0.6036 P = 0.0239	0.9250 P = 0.0005	0.6393 P = 0.0168	0.6500 P = 0.0150	0.6821 P = 0.0107	0.8464 P = 0.0015	0.6756 P = 0.0115	"Formación 7 β -HC"
1.0000	1.0000	0.3250 NS	0.8536 P = 0.0014	0.8536 P = 0.0014	0.5214 P = 0.0511	0.4964 P = 0.0632	0.5357 P = 0.0450	0.4714 P = 0.0777	0.6893 P = 0.0099	0.4290 NS	"Formación CT"
		1.0000	0.4321 NS	0.4321 NS	0.9107 P = 0.0007	0.7321 P = 0.0062	0.6071 P = 0.0231	0.6107 P = 0.0223	0.7000 P = 0.0088	0.5433 P = 0.0421	"Formación 7-CC"
			1.0000	1.0000	0.6250 P = 0.0194	0.3750 NS	0.4250 NS	0.3714 NS	0.6786 P = 0.1111	0.5630 P = 0.0352	"Formación 25-HC"
					1.0000	0.6893 P = 0.0099	0.6679 P = 0.0125	0.6929 P = 0.0095	0.8679 P = 0.0012	0.6506 P = 0.0149	"Formación total de OE"
						1.0000	0.8107 P = 0.0024	0.7679 P = 0.0041	0.7393 P = 0.0057	0.5362 P = 0.0448	ΔK_{232}
							1.0000	0.9821 0.0002	0.7321 0.0062	0.9488 0.0152	ΔK_{270}
								1.0000	0.7607 0.0044	0.6720 0.0119	ΔK_{303}
									1.0000	0.6595 0.0136	PC
										1.0000	IPM

^a Coeficiente de correlación de Spearman.

^b Grado de significación.

^c No significativo.

^d Símbolos: α -CE (5,6 α -epoxi-5 α -colest-3 β -ol), 7 β -HC (colest-5-en-3 β , 7 β -diol), CT (5 α -colest-3 β , 5, 6 β -triol), 7-CC (3 β -hidroxicolest-5-en-7-ona), 25-HC (colest-5-en-3 β , 25-diol).

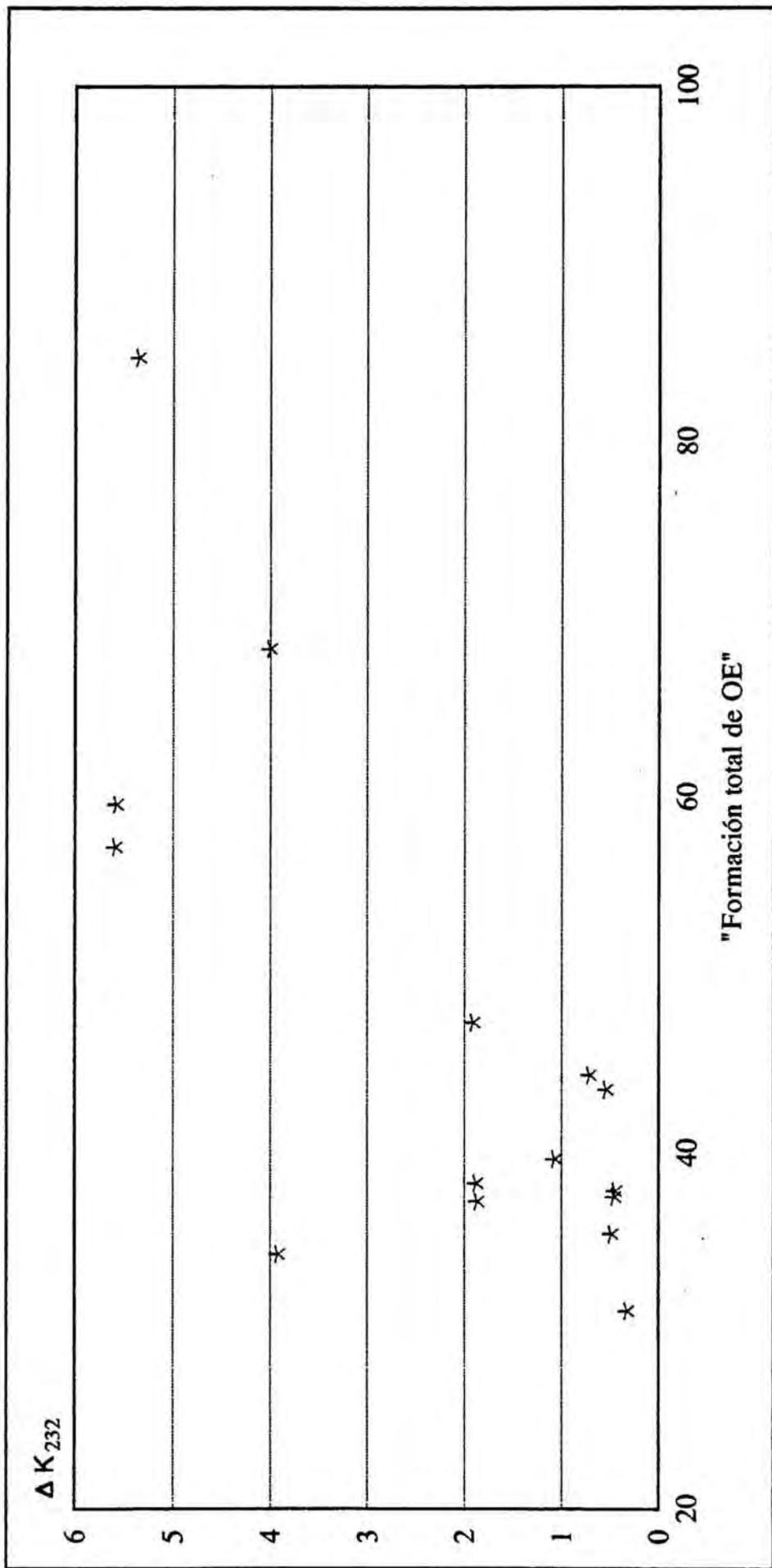


Figura 6-Representación de ΔK_{232} frente a "Formación total de OE".

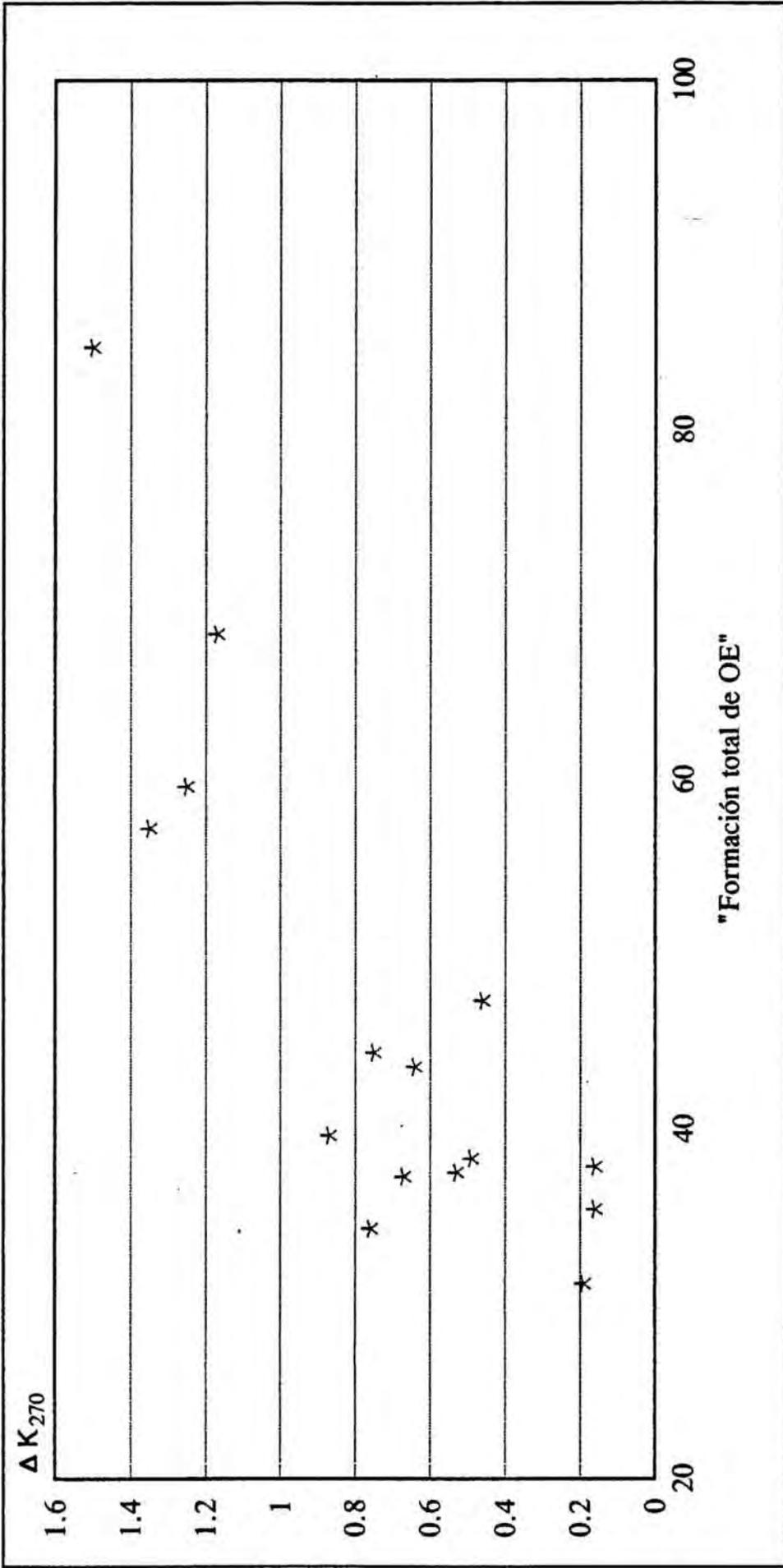


Figura 7-Representación de ΔK_{270} frente a "Formación total de OE".

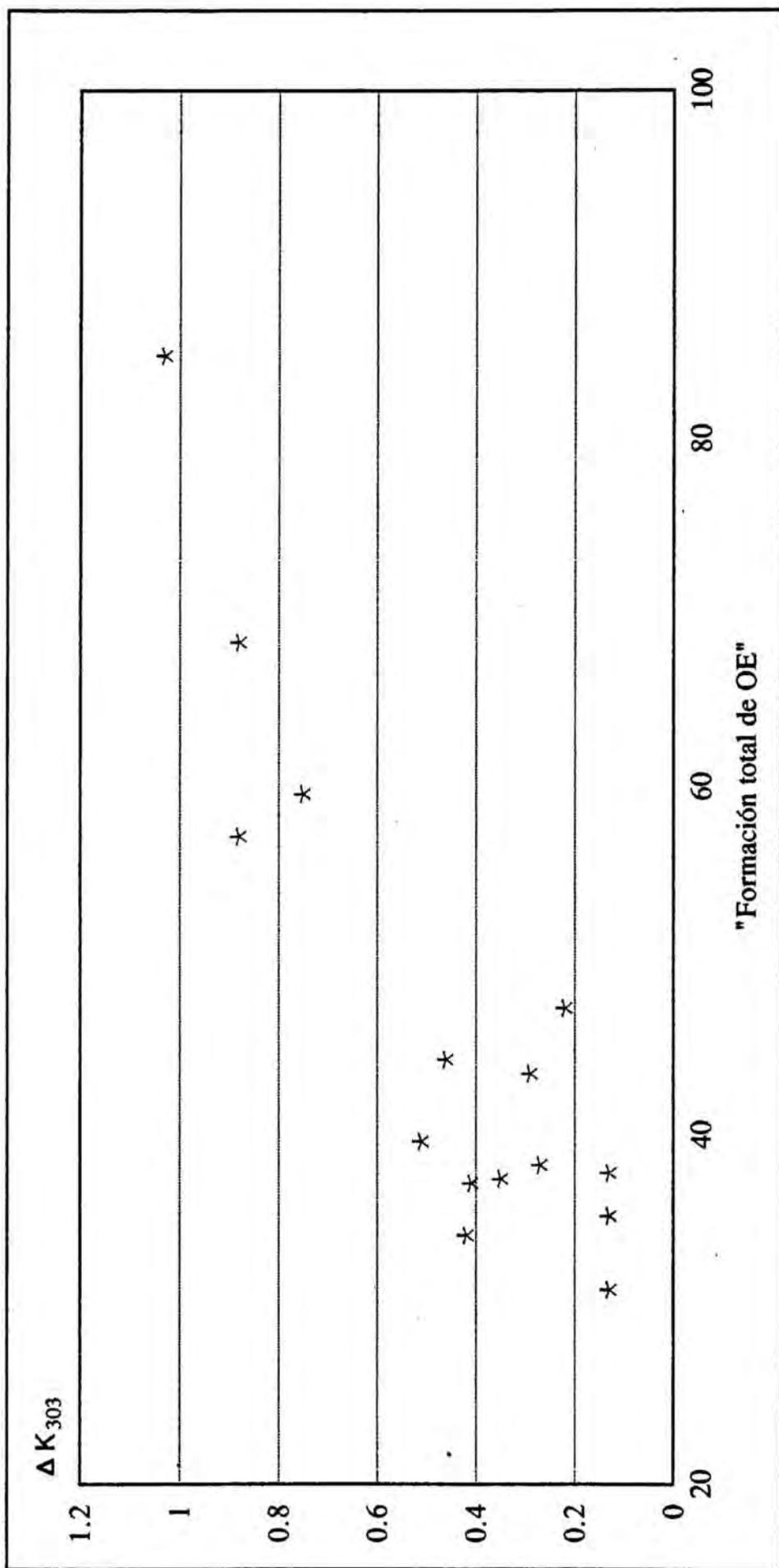


Figura 8-Representación de ΔK_{303} frente a "Formación total de OE".

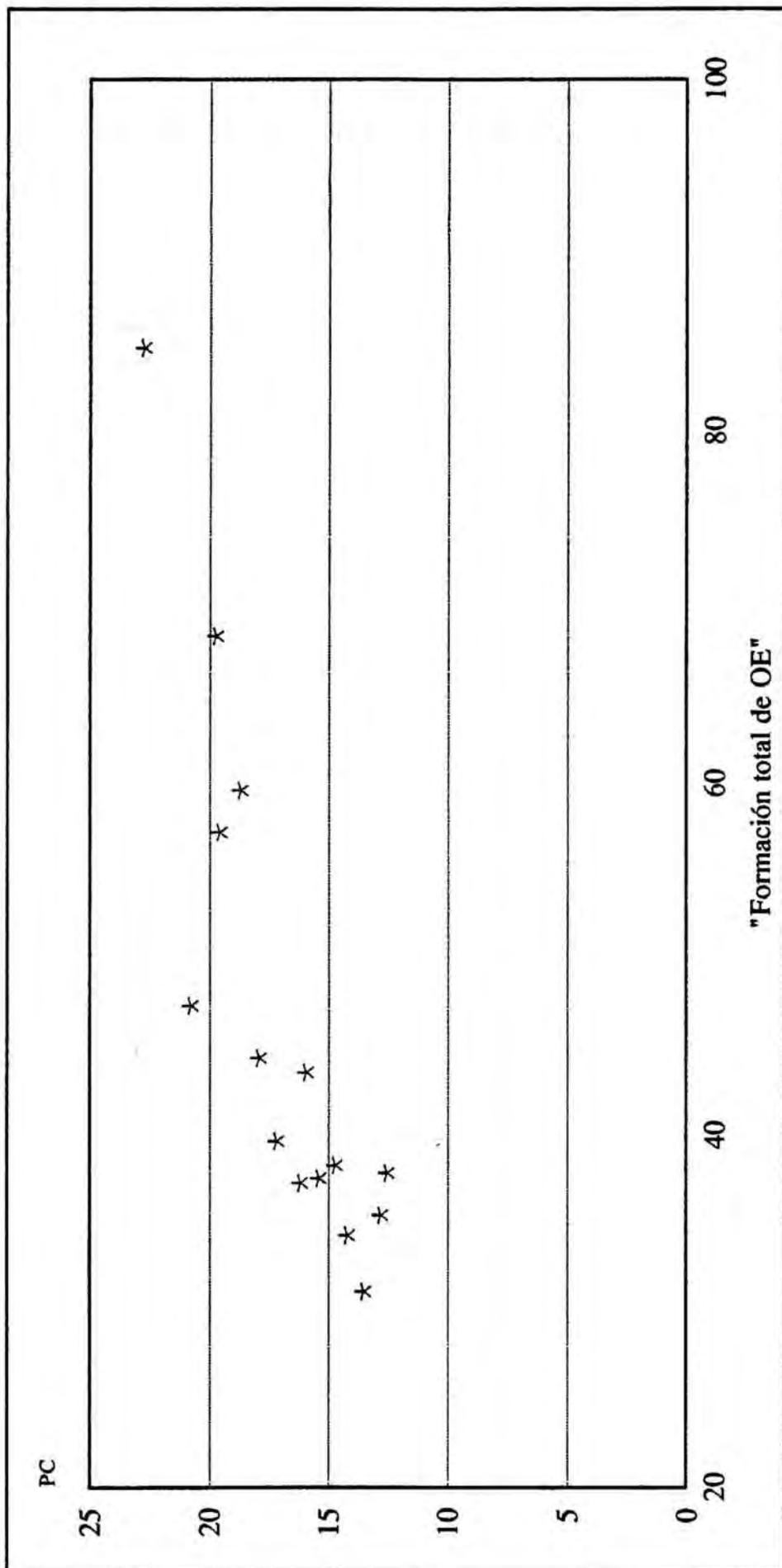
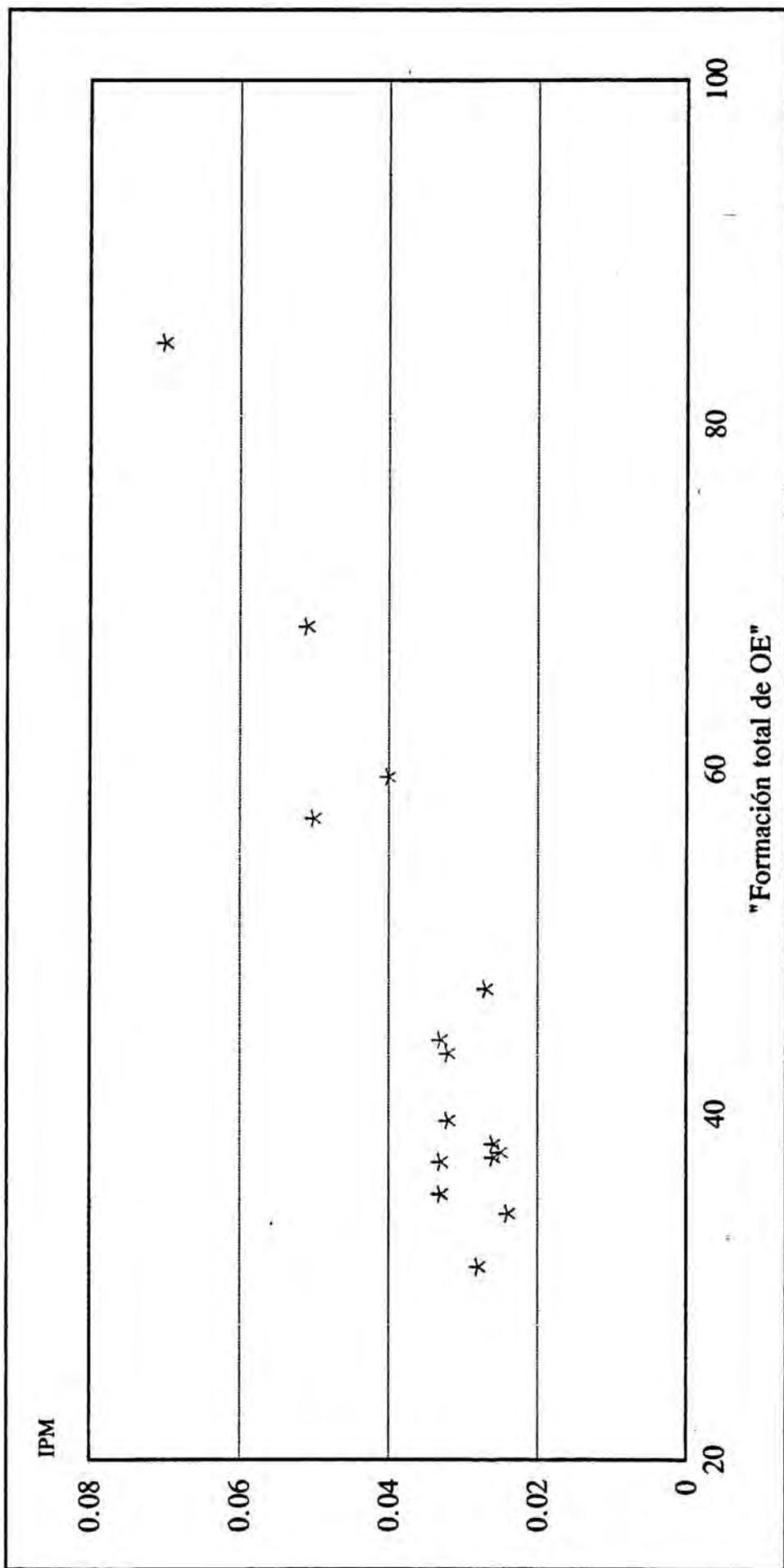


Figura 9-Representación de PC* frente a "Formación total de OE".

*PC: Pérdida de color.



3.8.DETERMINACIÓN DEL COLESTEROL.

Se determinó el contenido de colesterol en los huevos congelados de partida siguiendo el protocolo descrito en el apartado IV.A.3. (páginas 213-228).

3.8.1.RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Esta determinación se realizó ya que algunos autores, teniendo en cuenta que la formación de OE en un alimento es proporcional a la cantidad de colesterol que éste presenta, dan el contenido de OE en mg por g de colesterol (Morgan y Armstrong, 1987). Inicialmente, se pensó que en nuestro trabajo sería interesante dar los contenidos de OE en huevo en polvo referidos al colesterol que presentaba el correspondiente huevo congelado de partida. Esto no resultó ser así, ya que con una prueba de Spearman ($\alpha=0.05$) se comprobó que no se correlacionaban el colesterol en los huevos congelados y la formación de OE en sus correspondientes huevos en polvo. Por esta razón, en este trabajo los contenidos de OE no se refirieron al colesterol presente en el huevo congelado de partida. En la tabla 18 figuran los contenido de colesterol en los huevos congelados de partida (mg colesterol por g de materia seca) y el valor de la variable "Formación total de OE" para los correspondientes huevos en polvo (ppm sobre materia seca).

Tabla 18-Contenido de colesterol en los huevos congelados de partida y valor de la variable "Formación total de OE" para los correspondientes huevos en polvo.

Muestra ^b	Colesterol ^c	"Formación total de OE" en huevos en polvo ^a			
		T _A ^d	T _B ^d	T _C ^d	T _A + T _B + T _C ^e
1	17.34	37.84	31.16	35.43	104.43
2	16.13	34.30	37.27	68.34	139.92
3	16.42	59.60	57.20	84.74	201.54
4	16.27	38.30	37.53	47.33	123.15
5	16.51	39.66	44.37	43.57	127.60
6	16.48	33.44	52.35	72.10	157.88
\bar{X}	16.52	40.52	43.31	58.58	142.42

^a Valores de la variable "Formación total de OE" (ppm sobre materia seca) para los huevos en polvo.

^b Muestra de huevo congelado de partida.

^c Contenido de colesterol (mg/g materia seca) en los huevos congelados de partida.

^d T = temperaturas de atomización (temperatura de entrada-salida): T_A (180°C-120°C), T_B (193°C-128°C), T_C (231°C-142°C).

^e Suma de los valores de la variable "Formación total de OE" en los tres huevos en polvo procedentes de un mismo huevo congelado.

En relación con la afirmación de que la formación de OE en un alimento es proporcional a la cantidad de colesterol que éste presenta, podemos decir que es muy válida cuando se trata de alimentos con una diferencia sensible en sus contenidos de colesterol, pero no lo es tanto cuando las diferencias son pequeñas como en nuestro caso.

4. BIBLIOGRAFÍA.

Akhavan, I. y Wrolstad, R.E. (1980). Variation of Sugars and Acids During Ripening of Pears and in the Production and Storage of Pear Concentrate. *J. Food Sci.* **45**, 499-501.

AOAC. (1990). *Official methods of analysis of the AOAC* (K. Helrich, Ed.). Vol. 2, p. 853. AOAC Inc., Arlington, Virginia, EUA.

- Ashoor, S.H. y Zent, J.B. (1984). Maillard Browning of Common Amino Acids and Sugars. *J. Food Sci.* **49**, 1206-1207.
- Baldwin, R.E. (1977). Functional properties in foods. En *Egg science & technology* (W.J. Stadelmam y O.J. Cotterill, Ed.). p. 246-277. AVI publishing company Inc., Westport, Connecticut, EUA.
- Bergquist, D.H. (1964). Eggs. En *Food dehydration II. Products and technology* (W.B. Van Arsdell y M.J. Copley, Ed.). p. 652-693. AVI publishing company Inc., Westport, Connecticut, EUA.
- Bergquist, D.H. (1977). Egg dehydration. En *Egg science & technology* (W.J. Stadelmam y O.J. Cotterill, Ed.). p. 197-229. AVI publishing company Inc., Westport, Connecticut, EUA.
- Burley, R.W. y Vadehra, D.V. (1989). *The avian egg chemistry and biology*. p. 179-183. Jhon Wiley & Sons, Nueva York-Chichester-Brisbane-Toronto-Singapur.
- Cornwell, C.J. y Wrolstad, R.E. (1981). Causes of Browning in Pear Juice Concentrate During Storage. *J. Food Sci.* **46**, 515-518.
- Chichester, C.O. y Lee, T.C. (1981). Effect of food processing in the formation and destruction of toxic constituents of food. En *Impact of toxicology on food processing* (J.C. Ayres y J.C. Kirschman, Ed.). p. 35-56. AVI publishing company Inc., Westport, Connecticut, EUA.
- Egan, H., Kirk, R.S. y Sawyer, R. (1981) *Pearson's Chemical Analysis of foods*. p. 278-279. Longman Scientific & Technical, Harlow, Inglaterra, Reino Unido.
- Folch, J., Lees, M. y Sloane Stanley, G.H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **226**, 497-509.
- Galanos, D.S., Kapoulas, V.M. y Voudouris, E. (1968). Application de la spectrophotométrie ultra-violette dans la région des 315 nm au contrôle des huiles: détection de la falsification de l'huile d'olive par les huiles de grignons. *Rev. Fran. Corps Gras* **15**, 291-300.
- Gazzani, G. y Cuzzoni, M.T. (1984). Cinetica della reazione di imbrunimento non enzimatico fra ribosio, glicina, -lisina e -istidina in sistemi acquosi. *Rivista Soc. Ita. Sci. Alimentazione*, **13**, 467-470.
- Gibert, A. (1993). Comunicación personal.
- Gorman, J.M. (1977). Quality control and product specifications. En *Egg science & technology* (W.J. Stadelmam y O.J. Cotterill, Ed.). p. 230-245. AVI publishing company Inc., Westport, Connecticut, EUA.

Gunstone, F.D. (1986). Chemical properties. En *Lipid Handbook* (F.D. Gunstone, J.L. Harwood y F.B. Padley, Ed.). p. 453-457. Chapman and Hall Ltd., Nueva York ciudad, Nueva York, EUA.

IUPAC. (1986). Commission on oils, fats and derivatives. *Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives* (C. Paquot y A. Hautfenne, Ed.). p. 210-211. Blackwell Scientific Publications, Oxford-Londres-Edinburgo-Boston-Palo Alto-Melbourne.

Leatherhead Food Research Association. (1987). *Analytical methods manual*.

Morgan, J.N. y Armstrong, D.J. (1987). Formation of cholesterol-5,6-epoxides during Spray-drying of egg yolk. *J. Food Sci.* **52**, 1224-1227.

Reyes, F.G.R., Poocharoen, B. y Wrolstad, R.E. (1982). Maillard Browning Reaction of Sugar-Glycine Model Systems: Changes in Sugar Concentration, Color and Appearance. *J. Food Sci.* **47**, 1376-1377.

Simpson, K.L. (1985). Chemical changes in natural food pigments. En *Chemical changes in food during processing* (T. Richardson y J.W. Finley, Ed.). p. 409-418. AVI publishing company Inc., Wesport, Connecticut, EUA.

Tanaka, M., Nagashima, Y. y Taguchi, T. (1986). A Kinetic Study of the Non-enzymatic Browning Reaction Between Histamine and Glucose. *Bull. Japan Soc. Sci. Fish.* **52**, 1271-1274.

Toribio, J.L. y Lozano, J.E. (1984). Nonenzymatic Browning in Apple Juice Concentrate during Storage. *J. Food Sci.* **49**, 889-892.

Tsai, L.S. y Hudson, C.A. (1985). Cholesterol oxides in commercial dry egg products: Quantitation. *J. Food Sci.* **50**, 229-231, 237.

Tsai, CH., Kong, M. y Sun Pan, B. (1991). Water activity and temperature effects on nonenzymic browning of amino acids in dried squid and simulated model system. *J. Food Sci.* **56**, 665-670, 677.

Uzzan, A. (1956). Étude spectrophotométrique dans l'ultra-violet des huiles d'olives. Son application pour l'appréciation de la qualité de l'huile et la recherche des mélanges avec des huiles raffinées. *Rev. Fran. Corps Gras* **3**, 9-17.

Wolff, J.P. (1954). Étude spectrophotométrique du rancissement des huiles. *Rev. Fran. Corps Gras* **1**, 214-226.

Wolff, J.P. (1968). *Manuel d'analyse des corps gras*, p.259-261. Azoulay, Paris, Francia.

**IV. D. 3. FORMACIÓN DE OXIESTEROLES DURANTE LA PRODUCCIÓN Y
ALMACENAMIENTO DE HUEVO EN POLVO: EFECTO DE LA TEMPERATURA;
TIPO Y CONCENTRACIÓN DE ANTIOXIDANTE; Y TIEMPO Y
CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO.**

1. INTRODUCCIÓN.	403
2. PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO.	403
3. MATERIAL Y MÉTODOS.	410
1. Reactivos y patrones.	410
2. Muestras.	410
1. Preparación del huevo congelado para la atomización.	410
2. Adición de los antioxidantes.	411
3. Proceso de atomización: obtención de las muestras de huevo en polvo.	411
4. Envasado de las muestras.	413
3. Determinaciones analíticas.	413
4. Tratamiento estadístico.	414
5. Comprobación de si la presencia de antioxidantes afecta a las lecturas espectrofotométricas.	416
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	417
1. Efecto de la presencia de antioxidantes sobre las lecturas espectrofotométricas.	417
2. Resultados del diseño factorial.	419
1. Correlación múltiple.	423
2. ANOVA multifactorial.	425
3. Regresión múltiple.	454
5. CONCLUSIONES.	476
6. BIBLIOGRAFÍA.	477



1.INTRODUCCIÓN.

Las conclusiones del apartado anterior, en donde se observó que la temperatura de atomización influía en la formación de OE en huevo en polvo y que esta formación se correlacionaba con una serie de parámetros de calidad, entre los cuales se encontraban varios parámetros de oxidación relacionados con la fracción lipídica y la intensidad de pardeamiento producido por la reacción de Maillard, nos llevaron a plantear un estudio más completo. En este estudio, se pretendió confirmar la influencia de la temperatura de atomización en la formación de OE en huevo en polvo y, además, determinar la forma en que afectan los siguientes factores (variables controlables) a esta formación: tipo y concentración de antioxidante; y tiempo y condiciones de almacenamiento.

2.PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO.

Para estudiar la influencia de estos factores se planteó el siguiente diseño factorial: temperaturas de atomización (2) x tipo de antioxidante (2) x concentración de antioxidante (3) x tiempo de almacenamiento (3) x condiciones de almacenamiento (2), del cual se realizaron dos réplicas. Además de la "formación de oxisteroles", en este estudio se determinaron las siguientes respuestas (variables sometidas a estudio) o parámetros: humedad, a_w , incremento de las extinciones específicas, pérdida de color, pérdida de AGPI y la intensidad de pardeamiento producido por la reacción de Maillard. Se estudió la correlación lineal entre las diferentes respuestas. Este diseño se presenta esquemáticamente en la figura 1.

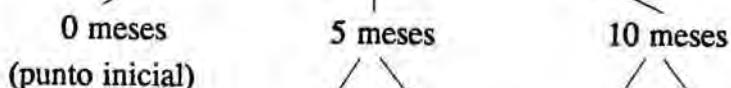
Figura 1-Esquema del diseño factorial empleado en este estudio.

FACTORES		
Temperaturas de atomización	Antioxidantes	Concentración de cada uno de los antioxidante (ppm)
T _A (170-117°C) ^a	PA + dl-α-T ^b	0
T _A (170-117°C)	PA + dl-α-T	100
T _A (170-117°C)	PA + dl-α-T	200
T _A (170-117°C)	GP	0
T _A (170-117°C)	GP	100
T _A (170-117°C)	GP	200
T _B (225-140°C)	PA + dl-α-T	0
T _B (225-140°C)	PA + dl-α-T	100
T _B (225-140°C)	PA + dl-α-T	200
T _B (225-140°C)	GP	0
T _B (225-140°C)	GP	100
T _B (225-140°C)	GP	200

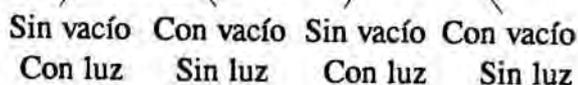
RESPUESTAS: humedad, a_w, incremento de las extinciones específicas, pérdida de color, pérdida de AGPI*, intensidad de pardeamiento producido por la reacción de Maillard y la "formación de oxisteroles".

OTROS FACTORES

Tiempo de almacenamiento:



Condiciones de almacenamiento:



^a Entre paréntesis figura la temperatura de entrada del aire en el cuerpo del atomizador - temperatura de salida de este aire.

^b Símbolos: PA, palmitato de ascorbilo; dl-α-T, dl-α-tocoferol, GP, Galato de propilo; AGPI, ácidos grasos polinsaturados; SV, sin vacío; y CV, con vacío

* Esta respuesta se determinó sólo para las muestras conservadas durante 10 meses y en 7 de las conservadas sin vacío durante 5 meses.

Los niveles de los diferentes factores ensayados se eligieron de acuerdo con los criterios que se exponen a continuación.

Elección de las temperaturas de atomización. En el estudio anterior se ensayaron las siguientes condiciones de temperatura:

- 1) T° de entrada del aire en el cuerpo del atomizador = 180 °C - T° salida = 120 °C.
- 2) T° de entrada del aire en el cuerpo del atomizador = 193 °C - T° salida = 128 °C.
- 3) T° de entrada del aire en el cuerpo del atomizador = 231 °C - T° salida = 142 °C.

De estas tres condiciones de temperatura se eligieron las dos más extremas, ya que, como es lógico, fueron las que presentaron una mayor diferencia en la formación de oxiesteroles. Las condiciones de temperatura utilizadas en este estudio, una vez ajustadas, fueron:

T_A) T° entrada = 170 °C - T° salida = 117 °C

T_B) T° entrada = 225 °C - T° salida = 140 °C

Elección de los antioxidantes y su concentración. Los antioxidantes según la definición de la FDA son sustancias que evitan la rancidez, decoloración y deterioro oxidativo. Estos compuestos se clasifican según su mecanismo de acción, básicamente en tres grupos: antirradicalarios, captadores de oxígeno y quelantes. Dentro de los antirradicalarios tenemos los sintéticos (BHA, BHT, TBHQ y los galatos) y los naturales (esencialmente tocoferoles). Estos antioxidantes actúan cediendo un hidrógeno de uno de sus grupos fenólicos a un radical lipídico, transformándose de esta manera, ellos mismos, en un radical mucho más estable que no interviene ni en la iniciación ni propagación de la oxidación lipídica. Por otro lado, entre los captadores del oxígeno se encuentran: el ácido ascórbico, el palmitato de ascorbilo, los sulfitos, etc. El mecanismo de acción de estos antioxidantes consiste en su reacción con las diferentes especies de oxígeno. Los agentes quelantes más utilizados son: ácido cítrico,

polifosfatos y EDTA. Estos compuestos presentan un efecto sinérgico con los antioxidantes de otros tipos, pues, actúan formando quelatos con los iones de metales como el hierro y cobre, que son poderosos prooxidantes.

En la elección de los antioxidantes para nuestro estudio se tuvo en cuenta la legislación de los diferentes países sobre los antioxidantes permitidos en ovoproductos y las características y mecanismo de acción de los diferentes antioxidantes.

La legislación de algunos de los principales países europeos sobre los antioxidantes permitidos en ovoproductos se resume en la tabla 1.

Tabla 1-Antioxidantes permitidos en los ovoproductos de diferentes países desarrollados (BOE, 1976; DOCE, 1992; Leatherhead Food Research Association, 1984).

País	Antioxidantes permitidos	Concentración máxima permitida (ppm)
Alemania	Ninguno.	
Bélgica	Ácido ascórbico.	1000
Dinamarca	Ninguno.	
España	Ninguno.	
Francia	Ácido ascórbico.	300
Holanda	Ácido ascórbico y sus sales (sódica y cálcica).	1000
Irlanda	Ácido ascórbico y sus sales (sódica y cálcica), palmitato de ascorbilo, tocoferoles, polifosfatos, EDTA, ácido cítrico, láctico, tartárico y las sales de estos tres ácidos.	BPF ^a
Luxemburgo	Ácido ascórbico.	1000
Portugal	Ácido ascórbico y su sal sódica o la combinación de estos dos compuestos.	200
Reino Unido	Ácido ascórbico y sus sales (sódica y cálcica), palmitato de ascorbilo y tocoferoles.	BPF
UE	Ácido ascórbico y sus sales (sódica i cálcica), palmitato y estearato de ascorbilo, tocoferoles, lecitinas, ácido cítrico, láctico y tartárico y las sales de estos tres ácidos.	BPF

^a Buenas prácticas de fabricación.

En la tabla se puede observar que el ácido ascórbico es el antioxidante permitido en mayor número de países. Así este compuesto fue uno de los antioxidantes elegidos para nuestro

estudio, aunque se utilizará en forma de palmitato de ascorbilo (PA), pues, esta forma es más soluble en grasas. Este antioxidante, además, posee la ventaja de que es termorresistente y que, por ello, se utiliza en productos deshidratados (Bourgeois, 1986). Por otro lado, el PA presenta un efecto sinérgico con los tocoferoles, compuestos que, a la vez, son muy efectivos para proteger a los carotenoides de la oxidación y de esta manera evitar la pérdida de coloración (Dziezak, 1986). No obstante, los tocoferoles presentan como principal inconveniente, para su utilización en nuestro estudio, su moderada termorresistencia (Dall'Aglio y Nicoli, 1992). A pesar de ello, se decidió añadir junto al PA cantidades idénticas de dl- α -tocoferol (antioxidante natural que no presenta problemas de toxicidad y por tanto, como el PA, no viene limitado por la legislación). Esto se hizo para ver si los tocoferoles eran capaces de evitar la oxidación (decoloración) durante el proceso de atomización en sí, pues, con posterioridad a este proceso estos antioxidantes posiblemente habrán sido destruidos en gran parte y el resto se destruirá de forma gradual en un corto espacio de tiempo. No obstante, en un estudio de Park y Addis (1986b), la mezcla PA (500 ppm) + dl- α -T (100 ppm) inhibió, durante 70 hr, la formación de OE en un medio de fritura (100 % sebo) sometido a 135 °C. Según esto, uno de los antioxidantes ensayados será la mezcla sinérgica formada por PA + dl- α -tocoferol (antirradicalario, pero con un cierto poder como captador de oxígeno, Bhagavan y Nair, 1992). Para el otro antioxidante se pensó en uno antirradicalario de tipo sintético. Estos antioxidantes tienen la ventaja de ser termoestables, muy solubles en grasa y muy potentes, pero su gran desventaja se encuentra en su elevada toxicidad. De entre estos antioxidantes los galatos parecen ser los que presentan menor toxicidad aunque no existen tantos estudios al respecto como para el BHA y BHT. Este fue el principal motivo para elegir el galato de propilo como segundo antioxidante a ensayar. Cabe señalar, que este compuesto dentro del grupo de antioxidantes sintéticos es uno de los más termolábiles pero soporta bien temperaturas de hasta 190 °C (Dziezak, 1986), con lo cual es más que suficiente para que soporte el proceso de atomización aplicado en nuestro estudio (temperatura máxima a la que puede llegar la partícula de huevo en polvo es de 117 °C o 140 °C).

Una vez seleccionados los antioxidantes se procedió a elegir las concentraciones a ensayar de estos compuestos. Para ello, se tuvo en cuenta la legislación (tabla 1), la concentración a la que estos compuestos presentaban la máxima actividad y los diferentes estudios

experimentales sobre el tema. De esta manera, las concentraciones elegidas fueron 0, 100 y 200 ppm sobre huevo líquido, pues, la legislación de Portugal, que es una de las menos permisivas en la adición de ácido ascórbico a ovoproductos, permite añadir hasta 200 ppm de este compuesto. Además, los tocoferoles presentan su máxima actividad entre 0.01%-0.02% (Dziezak, 1986) y en un estudio de Morgan y Armstrong (1987) en el que se estudia, de forma poco exhaustiva, la acción de varios antioxidantes antirradicalarios sintéticos (BHA, BHT y GP) sobre la formación de OE durante la obtención de huevo en polvo por atomización, se utilizaron estos antioxidantes a las concentraciones de 67 y 200 ppm sobre residuo seco, resultando ser el antioxidante más efectivo el GP.

En relación con el tema, es importante señalar el estudio de Rankin y Pike (1993) en el que se estudió como afectaban diversos antioxidantes naturales (alfa, gamma y delta-tocoferoles, oleoresina de romero, quercitina y mircitina) y el BHA sobre el proceso de autoxidación del colesterol en una dispersión acuosa a una temperatura de 80 °C y un pH de 5.5. Se eligió este pH porque es el de algunos productos cárnicos. Los resultados fueron que sólo los tocoferoles presentaron actividad, siendo más efectivos el delta y gamma. Una de las conclusiones más particulares de este trabajo es que los antioxidantes efectivos contra la oxidación de los AG insaturados no tienen porque inhibir la autoxidación del colesterol en este modelo experimental. En consonancia con estos resultados, Maerker y Unruh (1986) observaron que el BHT no inhibía la autoxidación del colesterol.

Elección de las condiciones y tiempo de almacenamiento. El huevo en polvo se almacenó sellado en bolsas de polipropileno o envasado al vacío en estas mismas bolsas y al amparo de la luz. Se eligieron estas dos condiciones de almacenamiento porque se quiso estudiar la existencia de posibles diferencias en la formación de OE entre dos sistemas de envasado perfectamente aplicables al huevo en polvo, desde el punto de vista de la rentabilidad y de las dificultades tecnológicas que ofrecen.

Los tiempos de almacenamiento elegidos fueron de 0, 5 y 10 meses, pues, al huevo en polvo se le da una vida útil de unos 12 meses y otros estudios al respecto suelen trabajar con períodos iguales o inferiores a los 12 meses (Nourooz-Zadeh y Appelqvist, 1987; Tsai y Hudson, 1985).

3.MATERIAL Y MÉTODOS.

3.1.REACTIVOS Y PATRONES.

Los antioxidantes utilizados fueron los siguientes: palmitato de ascorbilo (>99%) suministrado por Fluka Química AG (Buchs, Suiza), dl- α -tocoferol (95%) y galato de propilo (>99%) comprados a Sigma chemical Co. (St. Louis, MO 63178).

El monoestearato de glicerilo fue comprado a Henkel KGaA (Düsseldorf, Alemania).

Los demás reactivos utilizados fueron los que se especifican en los apartados IV.A.2.2.2 y IV.D.2.2, respectivamente, páginas 170 y 354.

Los patrones utilizados fueron los que se especifican en los apartados IV.A.2.2.2. y IV.D.2.2.3., respectivamente, páginas 170 y 354-355.

3.2.MUESTRAS.

Se analizaron las 120 muestras de huevo en polvo resultantes del diseño factorial planteado. Todas estas muestras se obtuvieron por atomización bajo diferentes condiciones a partir de un mismo huevo congelado que también se analizó para tener valores de referencia.

3.2.1.PREPARACIÓN DEL HUEVO CONGELADO PARA LA ATOMIZACIÓN.

Para realizar este estudio se partió de 12 kg de huevo congelado que se descongelaron y se homogeneizaron durante 2 minutos a 20000 rpm mediante un homogeneizador (Ystral electric drive 10/20 3000). Se tomó una muestra de este huevo sobre la cual se determinaron las extinciones específicas, el color, la composición en AG y el contenido en OE. A continuación se dispuso el huevo en 12 contenedores de 1 kg y a cada uno de ellos se le añadió la concentración de antioxidante correspondiente y se le asignó un número de orden de forma aleatoria. Estos contenedores se congelaron a - 20 °C hasta el momento de su atomización.

3.2.2. ADICIÓN DE LOS ANTIOXIDANTES.

El galato de propilo y el dl- α -tocoferol se añadieron disueltos en etanol. Las soluciones se prepararon de tal manera que al añadir 1 ml de estas soluciones a 100 g de huevo líquido se obtuviera la concentración de antioxidante deseada. El palmitato de ascorbilo, al ser menos soluble en grasas, se añadió de la misma manera, pero en forma de emulsión. La emulsión se preparó con monoestearato de glicerilo.

3.2.3. PROCESO DE ATOMIZACIÓN: OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS DE HUEVO EN POLVO.

La obtención de las muestras de huevo en polvo se realizó en un atomizador piloto (Niro Atomizer A/S, Copenhagen, Denmark) equipado con un calefactor eléctrico (fuente de calor indirecta). La relación de alimentación (10 ml/min), presión de aire (6 kg/cm²) y tiempo de residencia del huevo en polvo en el atomizador (25 min) se mantuvieron constantes para todas las pruebas.

Las temperaturas de entrada y de salida del aire en el cuerpo del atomizador fueron ajustadas, simultáneamente, mediante la variación del flujo de aire a través del sistema.

Para realizar la primera réplica del diseño factorial se atomizaron 500 g de cada uno de los contenedores siguiendo el número de orden asignado aleatoriamente. A continuación, para la segunda réplica se atomizaron los 500 g restantes según el mismo orden. En cada caso, a los 500 g de huevo se les añadió un 25 % de agua con el fin de controlar con mayor facilidad la alimentación del atomizador. Así, se obtuvieron dos lotes de huevo en polvo para cada una de las 12 condiciones que constan en la figura 2. Estos lotes se dividieron en cinco partes, dos de las cuales se envasaron al vacío, otras dos a presión atmosférica y la restante se analizó inmediatamente para conocer los valores de las diferentes respuestas tras la atomización (punto inicial del estudio de almacenamiento). De cada tipo de muestra envasado, una se almacenó durante 5 meses y la otra durante 10 meses. Una vez transcurrido este tiempo se determinaron los valores de las diferentes respuestas.

3.2.4. ENVASADO DE LAS MUESTRAS.

Las muestras se envasaron a presión atmosférica o al vacío en bolsas de polipropileno 20 x 20 cm utilizando una máquina Multivac (Wolfertschwenden, Alemania). Las muestras envasadas al vacío se envolvieron en papel de aluminio, para evitar la acción oxidante de la luz. Además, las diferentes muestras se agruparon de 5 en 5 y se envasaron conjuntamente, también a presión atmosférica o al vacío, en bolsas de polipropileno de 32 x 28 cm.

3.3. DETERMINACIONES ANALÍTICAS.

La humedad se determinó en las 120 muestras de huevo en polvo según se describe en el apartado IV.D.2.3.1.2. páginas 358-359

Las extinciones específicas y el color fueron determinadas en el huevo de partida y en las 120 muestras de huevo en polvo según se describe, respectivamente, en los apartados IV.D.2.3.4.1. (páginas 366-367) y IV.D.2.3.5.1. (páginas 372-373).

La intensidad de pardeamiento producido por la reacción de Maillard se determinó de la forma descrita en el apartado IV.D.2.3.6.1., página 378, pero, además de la lectura espectrofotométrica a 420 nm, se realizaron otras dos a 335 y 277 nm entre las cuales se halló la relación. La relación A_{335}/A_{280} obtenida por espectrofotometría fotoacústica sin defecación previa fue utilizada por Martel *et al.* (1987) para determinar la intensidad con la que se producía la reacción de Maillard en leches en polvo. La absorción a 280 nm vino dada por proteínas, mientras que a 335 fue debida a productos de la reacción de Maillard.

En nuestro trabajo se utilizó la relación A_{335}/A_{277} que también midió la intensidad con la que se había producido la reacción de Maillard. El máximo a 277 nm fue causado por proteínas que no precipitaban con tricloroacético al 10 %, la presencia de las cuales se comprobó en el extracto final mediante la reacción de Biuret. La absorción de estas proteínas en la zona UV es consecuencia de su contenido en aa aromáticos (triptófano, tirosina y fenilalanina) que absorben respectivamente a 278, 274.5 y 260 nm (Cheftel *et al.*, 1989).

El contenido en OE se determinó en el huevo de partida y en las 120 muestras de huevo en polvo según se describe en el apartado IV.A.2.3.7., página 380.

La composición en AG se determinó en el huevo de partida, en todas las muestras de huevo en polvo almacenadas durante 10 meses ($n = 44$) y en 7 de las muestras almacenadas durante 5 meses, envasadas a presión atmosférica. La determinación se realizó según se describe en el apartado IV.A.2., páginas 169-177, partiendo en el caso del huevo en polvo de 0.5 g de muestra. La composición se expresó como normalización interna corregida y la diferencia entre la proporción de los diferentes AGPI presentes en el huevo de partida y la proporción de estos AG en el huevo en polvo dio lugar a la respuesta pérdida de AGPI. Los AGPI que se perdieron de una forma más notable fueron el C20:4 n-6 y el C22:6 n-3, la pérdida de los cuales fue estudiada en nuestro trabajo.

Determinación de la actividad del agua: se determinó en las 120 muestras de huevo en polvo con un aparato Thermoconstanter Humidat TH-2 (Novasina, Pfäffikon, Suiza)

3.4. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO.

El diseño factorial planteado contempló los factores y respuestas que figuran en la tabla 2.

Tabla 2-Factores y respuestas estudiados en el diseño factorial.

FACTORES	RESPUESTAS
Temperatura de atomización (T_A y T_B).	Humedad y a_w .
Tipo de antioxidante (PA + dl- α -T y GP).	Incremento de las extinciones específicas (K_{232} , K_{270} y K_{303}).
Concentración de antioxidante (0, 100 y 200 ppm).	Pérdida de color.
Tiempo de almacenamiento (0, 5 y 10 meses).	Pérdida de AGPI (C20:4 n-6 y C22:6 n-3).
Condiciones de almacenamiento (CV y SV).	"Formación de oxiesteroles"
	Intensidad de pardeamiento debida a la reacción de Maillard (IPM) medida como absorbancia a 420 nm e Intensidad de esta reacción (IRM) medida como la relación de absorbancias (A_{335}/A_{277}).

En el caso de la temperatura de atomización, el tratamiento estadístico (ecuaciones de regresión) y las diferentes representaciones gráficas se realizaron utilizando la temperatura de salida del aire del cuerpo del atomizador, pues, esta es la temperatura máxima que alcanzan las partículas de huevo en polvo y, por tanto, la más representativa de la temperatura en el interior del atomizador.

La definición de cada una de estas respuestas y la forma en que se expresaron los resultados se detallan a continuación:

- la humedad se expresó como % de H₂O;
- la a_w se expresó en tanto por uno;
- incremento de la extinción específica = extinción específica para el huevo en polvo - extinción específica para el correspondiente huevo congelado de partida;
- pérdida de color = intensidad de coloración a 440 nm (expresada como $\mu\text{g } \beta\text{-caroteno/g}$ materia seca) en huevo congelado de partida - intensidad de coloración a 440 nm en el correspondiente huevo en polvo;
- pérdida de AGPI = proporción (normalización interna corregida en $\%_{\infty}$) de AGPI en el huevo de partida - proporción de AGPI en el huevo en polvo;
- "formación de oxiesterol" = contenido de oxiesterol en el huevo en polvo (ppm sobre materia seca) - contenido de oxiesterol en el huevo congelado de partida;
- intensidad de pardeamiento de Maillard (IPM) en huevo en polvo expresada como absorbancia a 420 nm/g de materia seca;
- intensidad con la que produce la reacción de Maillard medida como la relación de absorbancia a 335 y 277 nm.

Los tratamientos estadísticos que se aplicaron sobre los resultados obtenidos en el diseño factorial fueron:

- Correlación múltiple entre las diferentes respuestas, para estudiar si existía relación lineal entre ellas.
- ANOVA multifactorial para conocer cuales son los factores que influyen sobre cada una de las respuestas.
- Regresión múltiple por el método de mínimos cuadrados para ver como influyen los factores cuantitativos sobre una determinada respuesta. La selección de las variables que influyan de forma significativa ($P \leq 0.10$) sobre las respuestas se realizó mediante el procedimiento "stepwise variable selection".
- Representación, a modo de ejemplo, de algunas de las superficies de respuesta.

3.5.COMPROBACIÓN DE SI LA PRESENCIA DE ANTIOXIDANTES AFECTA A LAS LECTURAS ESPECTROFOTOMÉTRICAS.

Los antioxidantes utilizados en nuestro estudio presentan absorción en la zona UV del espectro, con máximos situados a 231 y 273 nm para el GP y a 209, 223, 245 y 285 nm para la mezcla sinérgica PA + dl- α -T.

Para realizar esta comprobación se prepararon sendas soluciones etanólicas de GP y de la mezcla sinérgica AP + dl- α -T, que se añadieron de la manera descrita anteriormente sobre 100 ml de agua Milli-Q. De esta manera, se obtuvieron 2 soluciones acuosas de cada antioxidante a las concentraciones 100 y 200 ppm. Sobre 3.5 ml de cada una de estas soluciones se aplicó todo el proceso analítico necesario para determinar IPM (A_{420}) e IRM (A_{335}/A_{277}) y las extinciones específicas (K_{232} , K_{270} y K_{303}).

4.RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1.EFECTO DE LA PRESENCIA DE ANTIOXIDANTES SOBRE LAS LECTURAS ESPECTROFOTOMÉTRICAS.

Los resultados obtenidos en el experimento descrito anteriormente demostraron que el extracto acuoso obtenido con ácido tricloroacético al 10 % a partir de las soluciones de GP presentó un máximo a 273 nm. Éste fue debido a la presencia de este antioxidante en el extracto, lo cual afecta lógicamente a la relación A_{335}/A_{277} , utilizada para medir la intensidad con la que se produce la reacción de Maillard (figura 3).

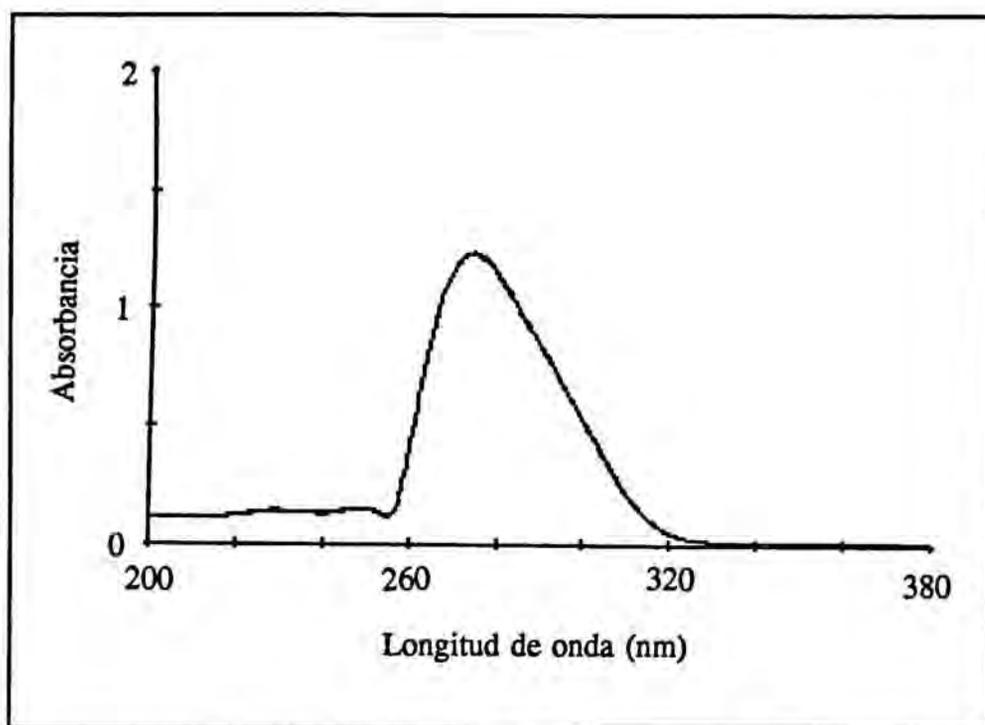


Figura 3-Espectro de absorción del extracto acuoso obtenido a partir de una solución de galato de propilo de 100 ppm de concentración.

En cambio, cuando se partió de las soluciones de AP + dl- α -T el extracto acuoso obtenido con tricloroacético al 10 % prácticamente no presentó absorción a 277 y 335 nm (figura 4).

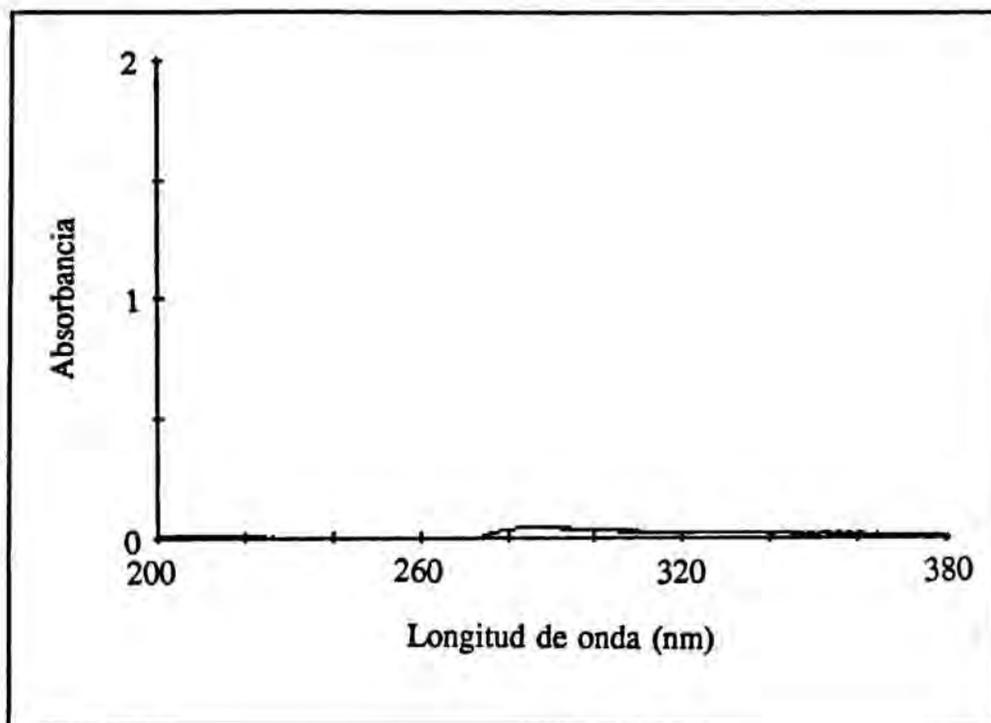


Figura 4-Espectro de absorción del extracto acuoso obtenido a partir de una solución de palmitato de ascorbilo y dl- α -tocoferol a 200 ppm de concentración.

El extracto acuoso obtenido con tricloroacético al 10 % no presentó absorción a 420 nm para ninguna de las soluciones antioxidantes de partida.

Para el caso de las extinciones específicas se comprobó que el galato de propilo implicó un ligerísimo aumento de las absorciones en el sentido $_303 < _270 < _232$ y que la mezcla AP + dl- α -T causó un aumento ligeramente mayor en el mismo sentido.

Según estos resultados la presencia de antioxidantes en el huevo en polvo afecta en diferente medida a las respuestas: IRM; y K_{232} , K_{270} y K_{303} . No obstante, este hecho, al trabajar con un diseño factorial, no anula la validez de los resultados obtenidos, pues, al estudiarse las respuestas en función de los factores no implica ninguna dificultad de interpretación y como veremos más adelante al estudiar el efecto de los diferentes factores sobre estas cuatro respuestas se discierne claramente si el efecto es debido a la absorción de los antioxidantes o al factor estudiado.

4.2.RESULTADOS DEL DISEÑO FACTORIAL.

Sobre los resultados de las diferentes determinaciones realizadas en las 120 muestras se aplicaron los tratamientos estadísticos contemplados anteriormente. Las tablas 3 y 4 contienen los valores medios de las diferentes respuestas estudiadas en función de los diferentes factores y de sus interacciones.

Tabla 3-Medias de las diferentes respuestas estudiadas en función de los factores (continua).

Respuestas		n	IPM ^a	IRM ^a	α_w^b	Humedad	$-K_{2x}^c$	$-K_{2y}^c$	$-K_{2z}^c$	Pétida de color	*Formación α -CE [™]	*Formación 7 β -HC [™]	*Formación CT [™]	*Formación 7-CG [™]	*Formación 25-HC [™]
Media global		120	0.0518	0.1144	0.283	3.69	7.1727	1.4515	0.8906	15.7195	12.40	30.80	6.14	23.31	1.74
Factores															
Temperatura (A)	117-170 °C	60	0.0499	0.0939	0.283	3.78	6.7201	1.2068	0.6867	14.8439	9.12	24.50	4.87	18.54	1.54
	140-225 °C	60	0.0537	0.1349	0.284	3.61	7.6253	1.6963	1.0946	16.5952	15.67	37.10	7.42	28.08	1.93
	PA+dl- α -T	60	0.0528	0.1273	0.285	3.72	7.1282	1.4298	0.8849	15.7659	12.99	32.56	6.52	24.09	1.82
Tipo antioxidante (B)	GP	60	0.0507	0.1015	0.281	3.67	7.2172	1.4733	0.8963	15.6732	11.81	29.03	5.76	22.53	1.66
	0 ppm	40	0.0495	0.1174	0.276	3.55	6.8922	1.2429	0.6913	16.2863	11.95	31.63	6.97	22.73	1.74
	100 ppm	40	0.0534	0.1142	0.285	3.74	7.2019	1.4976	0.9351	15.6107	12.25	30.16	5.81	24.11	1.69
Concentración antioxidante (C)	200 ppm	40	0.0523	0.1116	0.289	3.79	7.4241	1.6140	1.0455	15.2616	12.99	30.60	6.54	23.09	1.78
	0 meses	24	0.0534	0.1081	0.123	1.96	6.3903	1.3688	0.8484	12.0168	4.67	12.77	2.06	10.35	1.12
	5 meses, SV	24	0.0431	0.1086	0.378	4.67	7.4128	1.4714	0.8920	16.3678	10.63	27.44	6.63	24.31	1.55
Tiempo y condiciones de almacenamiento (D)	5 meses, CV	24	0.0482	0.1081	0.173	2.46	6.8960	1.4536	0.8789	14.8294	8.19	18.94	3.49	18.30	1.30
	10 meses, SV	24	0.0535	0.1278	0.496	6.09	8.0661	1.5109	0.9206	19.5137	24.33	55.86	11.99	38.27	2.67
	10 meses, CV	24	0.0606	0.1195	0.247	3.29	7.0983	1.4530	0.9131	15.8699	14.18	38.97	6.55	25.33	2.05
Interacciones entre factores															
AxB	117°CxPA+dl- α -T	30	0.0504	0.1058	0.285	3.84	6.6799	1.2039	0.6995	14.5659	9.52	26.05	5.12	18.30	1.62
	117°CxGP	30	0.0493	0.0821	0.281	3.72	6.7604	1.2097	0.6738	15.1219	8.74	22.94	4.61	18.79	1.46
	140°CxPA+dl- α -T	30	0.0552	0.1489	0.286	3.59	7.5766	1.6557	1.0703	16.9659	16.46	39.06	7.92	29.89	2.01
AxC	140°CxGP	30	0.0521	0.1209	0.282	3.62	7.6741	1.7368	1.1188	16.2245	14.88	35.13	6.92	26.27	1.85
	117°Cx0ppm	20	0.0445	0.0832	0.271	3.46	6.2229	0.9127	0.4010	15.2459	6.64	20.78	4.08	16.25	1.46
	117°Cx100ppm	20	0.0522	0.0964	0.286	3.85	6.7550	1.2488	0.7357	14.7234	9.30	23.85	4.82	19.71	1.48
AxD	117°Cx200ppm	20	0.0528	0.1022	0.292	4.03	7.1825	1.4589	0.9234	14.5624	11.42	28.85	5.69	19.67	1.68
	140°Cx0ppm	20	0.0545	0.1516	0.281	3.64	7.5616	1.5732	0.9815	17.3267	17.27	42.48	8.06	29.21	2.02
	140°Cx100ppm	20	0.0546	0.1321	0.285	3.63	7.6488	1.7464	1.1345	16.4981	15.17	36.46	6.79	28.51	1.90
AxD	140°Cx200ppm	20	0.0518	0.1210	0.287	3.56	7.6656	1.7692	1.1677	15.9609	14.56	32.34	7.39	26.51	1.89
	117°Cx0 meses	12	0.0539	0.0885	0.133	2.18	5.9957	1.1429	0.6443	11.4251	3.53	10.96	1.79	9.53	1.09
	117°Cx5 meses, SV	12	0.0386	0.0860	0.378	4.72	6.8779	1.1781	0.6555	15.1667	7.21	20.23	4.55	17.71	1.31
AxD	117°Cx5 meses, CV	12	0.0488	0.0870	0.171	2.54	6.3994	1.1639	0.6337	14.5750	4.38	11.90	2.61	12.17	1.09
	117°Cx10 meses, SV	12	0.0478	0.1024	0.491	6.17	7.4504	1.2839	0.7562	17.4460	18.35	45.50	9.88	30.67	2.37
	117°Cx10 meses, CV	12	0.0602	0.1057	0.241	3.29	6.8773	1.2652	0.7436	15.6067	12.15	33.89	5.50	22.64	1.84
AxD	140°Cx0 meses	12	0.0529	0.1277	0.113	1.75	6.7849	1.5947	1.0525	12.6086	5.82	14.58	2.33	11.17	1.14
	140°Cx5 meses, SV	12	0.0476	0.1311	0.379	4.62	7.9477	1.7648	1.1286	17.5690	14.05	34.64	8.71	30.91	1.79
	140°Cx5 meses, CV	12	0.0476	0.1292	0.176	2.38	7.3927	1.7433	1.1241	15.0838	11.98	25.98	4.36	24.43	1.52
AxD	140°Cx10 meses, SV	12	0.0591	0.1533	0.500	6.01	8.6820	1.7380	1.0851	21.5814	30.30	66.23	14.10	45.86	2.96
	140°Cx10 meses, CV	12	0.0611	0.1332	0.252	3.29	7.3193	1.6407	1.0826	16.1331	16.21	44.05	7.59	28.01	2.26

Tabla 3-Medias de las diferentes respuestas estudiadas en función de los factores (continuación).

Respuestas		n	IPM*	IRM*	a_w *	Humedad	$-K_{ext}$ *	$-K_{ext}$ *	$-K_{ext}$ *	Pérdida de color	*Formación α -CE**	*Formación 7B-HC**	*Formación CT**	*Formación 7-CC**	*Formación 25-HC**
Interacciones entre factores															
BxC	PA+dl- α -Tx0ppm	20	0.0495	0.1174	0.276	3.55	6.8922	1.2429	0.6913	16.2863	11.95	31.63	6.07	22.73	1.74
	PA+dl- α -Tx100ppm	20	0.0573	0.1341	0.287	3.78	7.2727	1.5272	0.9752	15.3182	13.38	32.96	6.38	25.24	1.82
	PA+dl- α -Tx200ppm	20	0.0516	0.1305	0.294	3.82	7.2198	1.5193	0.9882	15.6932	13.63	33.08	7.10	24.30	1.90
	GPx0ppm	20	0.0495	0.1174	0.276	3.55	6.8922	1.2429	0.6913	16.2863	11.95	31.63	6.07	22.73	1.74
	GPx100ppm	20	0.0495	0.0943	0.284	3.70	7.1311	1.4681	0.8949	15.9033	11.11	27.35	5.24	22.97	1.56
	GPx200ppm	20	0.0530	0.0928	0.285	3.77	7.6283	1.7088	1.1028	14.8301	12.35	28.11	5.98	21.88	1.67
	PA+dl- α -Tx0 meses	12	0.0528	0.1210	0.124	1.99	6.4615	1.3675	0.8688	11.9583	5.08	13.71	2.16	10.50	1.15
	PA+dl- α -Tx5 meses, SV	12	0.0455	0.1213	0.381	4.68	7.4123	1.4388	0.8770	16.3768	11.17	29.51	7.27	25.57	1.63
	PA+dl- α -Tx5 meses, CV	12	0.0487	0.1203	0.174	2.50	6.8279	1.4110	0.8596	14.9030	8.37	19.77	3.62	18.31	1.35
	PA+dl- α -Tx10 meses, SV	12	0.0556	0.1442	0.499	6.10	8.0311	1.5064	0.9140	19.6127	26.55	59.29	12.75	40.70	2.77
	PA+dl- α -Tx10 meses, CV	12	0.0615	0.1300	0.249	3.31	6.9083	1.4255	0.9051	15.9785	13.76	40.52	6.79	25.38	2.19
	BxD	GPx0 meses	12	0.0540	0.0952	0.122	1.94	6.3191	1.3701	0.8280	12.0753	4.26	11.83	1.95	10.21
GPx5 meses, SV		12	0.0406	0.0959	0.376	4.66	7.4133	1.5040	0.9071	16.3388	10.08	25.37	5.99	23.05	1.47
GPx5 meses, CV		12	0.0477	0.0960	0.173	2.41	6.9641	1.4962	0.8983	14.7558	7.99	18.12	3.35	18.28	1.26
GPx10 meses, SV		12	0.0514	0.1115	0.492	6.08	8.1012	1.5155	0.9273	19.4148	22.10	52.43	11.22	35.83	2.57
GPx10 meses, CV		12	0.0597	0.1089	0.245	3.27	7.2883	1.4804	0.9210	15.7613	14.60	37.42	6.31	25.27	1.90
GPx20 meses		8	0.0549	0.1133	0.122	1.84	6.0685	1.1524	0.6372	12.3160	4.14	11.92	1.89	9.08	1.04
Opnmx5 meses, SV		8	0.0374	0.1103	0.374	4.57	7.2152	1.3139	0.7292	16.4211	11.78	31.44	7.54	25.76	1.69
Opnmx5 meses, CV		8	0.0454	0.1125	0.169	2.24	6.6119	1.2346	0.6787	15.8350	9.28	19.24	3.20	19.28	1.32
Opnmx10 meses, SV		8	0.0509	0.1285	0.492	6.07	7.8664	1.3090	0.7212	19.8631	21.18	57.94	10.76	33.46	2.49
Opnmx10 meses, CV		8	0.0590	0.1223	0.221	3.04	6.7022	1.2048	0.6901	16.9964	13.39	37.63	6.96	26.07	2.15
Opnmx20 meses		8	0.0550	0.1076	0.130	2.04	6.4293	1.4138	0.8936	11.9512	4.78	12.57	2.04	11.58	1.09
CxD		100ppmx5 meses, SV	8	0.0447	0.1100	0.378	4.69	7.4065	1.5125	0.9267	16.3887	10.11	25.22	5.77	23.98
	100ppmx5 meses, CV	8	0.0488	0.1064	0.172	2.49	6.9706	1.5388	0.9491	14.7363	8.15	19.05	3.84	19.66	1.39
	100ppmx10 meses, SV	8	0.0586	0.1253	0.496	6.09	7.9176	1.4996	0.9317	19.5559	23.45	54.21	11.08	38.88	2.49
	100ppmx10 meses, CV	8	0.0628	0.1219	0.251	3.37	7.2854	1.5235	0.9743	15.4017	14.75	39.73	6.32	26.44	1.98
	200ppmx0 meses	8	0.0503	0.1034	0.117	2.01	6.6732	1.5402	1.0144	11.7834	5.09	13.81	2.24	10.39	1.22
	200ppmx5 meses, SV	8	0.0471	0.1054	0.384	4.76	7.6167	1.5879	1.0203	16.2938	9.99	25.65	6.58	23.20	1.47
	200ppmx5 meses, CV	8	0.0505	0.1055	0.180	2.64	7.1057	1.5874	1.0090	13.8969	7.11	18.54	3.42	15.95	1.20
	200ppmx10 meses, SV	8	0.0536	0.1297	0.499	6.11	8.4175	1.7242	1.1090	19.1223	28.35	55.44	14.12	42.46	3.03
	200ppmx10 meses, CV	8	0.0601	0.1142	0.268	3.46	7.3073	1.6306	1.0749	15.2118	14.41	39.54	6.36	23.47	2.00

* Símbolos: IPM, intensidad de pardamiento producido por la reacción de Maillard medida como absorbancia a 420 nm; IRM, intensidad de la que se produce la reacción de Maillard medida como la relación entre las absorbancias a 335 nm y a 277 nm; a_w , actividad del agua; $-K_{ext}$, incremento de la extinción específica a 232 nm; $-K_{ext}$, incremento de la extinción específica a 270 nm; $-K_{ext}$, incremento de la extinción específica a 303 nm; α -CE, 5,6 α -epoxi-5 α -colestan-3 β -ol, 7 β -HC, colesta-5-en-3 β , 7 β -diol; CT, 5 α -colestan-3 β , 5 β -tríol; 7-CC, 3 β -hidroxicolesta-5-en-7 α -y 25-HC, colesta-5-en-3 β , 25-diol. Los resultados para cada respuesta se expresaron como se detalla en la páginas 415.

Tabla 4-Medias para la pérdida de C20:4 n-6 y C22:6 n-3 en función de los factores.*

Respuestas		n	Pérdida de C20:4 n-6*	Pérdida de C22:6 n-3*
Media global		48	1.58	1.99
Factores				
Temperatura (A)	117-170 °C	24	1.01	1.29
	140-225 °C	24	2.14	2.70
Tipo antioxidante (B)	PA+dl- α -T	24	1.76	2.15
	GP	24	1.39	1.84
Concentración antioxidante (C)	0 ppm	16	1.46	1.77
	100 ppm	16	1.44	1.95
	200 ppm	16	1.83	2.26
Condiciones de almacenamiento (D)	SV	24	1.89	2.37
	CV	24	1.26	1.61
Interacciones entre factores				
AxB	117°CxPA+dl- α -T	12	1.15	1.50
	117°CxGP	12	0.87	1.07
	140°CxPA+dl- α -T	12	2.38	2.79
	140°CxGP	12	1.91	2.60
AxC	117°Cx0ppm	8	0.74	0.65
	117°Cx100ppm	8	0.87	1.43
	117°Cx200ppm	8	1.43	1.78
	140°Cx0ppm	8	2.17	2.89
	140°Cx100ppm	8	2.02	2.47
	140°Cx200ppm	8	2.23	2.74
AxD	117°CxSV	12	1.18	1.56
	117°CxCV	12	0.85	1.02
	140°CxSV	12	2.61	3.19
	140°CxCV	12	1.67	2.21
BxC	PA+dl- α -Tx0ppm	8	1.46	1.77
	PA+dl- α -Tx100ppm	8	1.74	2.23
	PA+dl- α -Tx200ppm	8	2.09	2.44
	GPx0ppm	8	1.46	1.77
	GPx100ppm	8	1.15	1.67
	GPx200ppm	8	1.56	2.07
BxD	PA+dl- α -TxSV	12	2.11	2.62
	PA+dl- α -TxCV	12	1.41	1.67
	GPxSV	12	1.67	2.12
	GPxCV	12	1.11	1.55
CxD	0ppmxSV	8	1.87	2.15
	0ppmxCV	8	1.04	1.39
	100ppmxSV	8	1.67	2.35
	100ppmxCV	8	1.21	1.56
	200ppmxSV	8	2.14	2.62
	200ppmxCV	8	1.52	1.89

* Los resultados se expresan según se detalla en la páginas 415.

4.2.1. CORRELACIÓN MÚLTIPLE.

Un estudio de correlación múltiple entre las diferentes respuestas nos dio los coeficientes de correlación de Pearson que figuran en la tabla 5, muchos de los cuales fueron estadísticamente significativos, indicando la existencia de relación lineal entre muchas de las respuestas estudiadas. Entre estas relaciones, cabe destacar la elevada correlación entre el contenido de los diferentes oxisteroles y las restantes respuestas estudiadas, a excepción de con la intensidad de pardeamiento producido por la reacción de Maillard (IPM), K_{270} y K_{303} . También cabe señalar que de los diferentes parámetros de oxidación estudiados el que se correlaciona mejor con la "formación de oxisteroles" es la pérdida de color, relacionada a su vez con la oxidación de los carotenoides. Otra observación interesante es que la K_{232} , que mide la oxidación primaria de los AGI, se correlaciona mucho mejor con la "formación de oxisteroles" que la K_{270} y la K_{303} , que miden la oxidación secundaria de estos compuestos. La "formación de los diferentes OE" se encuentra altamente correlacionada, lo cual indica que estos compuestos guardan un cierto paralelismo, en cuanto a su patrón de formación. Cabe también destacar la elevada y lógica correlación existente entre respuestas como, a_w y humedad; K_{270} y K_{303} ; y pérdida de C20:4 n-6 y C22:6 n-3. El comportamiento similar de estos pares de respuestas permitió escoger una sola de ellas para determinados estudios estadísticos que se realizaron posteriormente. Por último, y también referente al estudio de correlación se observó que las únicas correlaciones no significativas fueron las de la IPM con la a_w , humedad, K_{232} , K_{270} , K_{303} , pérdida de C20:4 n-6, pérdida de C22:6 n-3 y color; y de la humedad con la K_{270} y K_{303} (tabla 5).

Tabla 5-Coeficientes de correlación de Pearson y su grado de significación (n = 120).

IPM* (A ₃₃₅)	IRM* (A ₃₃₅ /A ₂₇₇)	a _w *	Humedad	-K ₃₃₂ *	-K ₅₇₀ *	-K ₃₀₃ *	Pérdida de C20:4 n-6*	Pérdida de C22:6 n-3*	Pérdida de color	Formación α-CE**	Formación 7β-HC**	Formación CT**	Formación 7-CC**	Formación 25-HC**	IPM (A ₃₃₅)
1.0000	0.4779 ^b	-0.0915	-0.0630	0.1566	0.2533	0.2847	-0.0117	0.0225	0.0920	0.3077	0.3303	0.1849	0.2216	0.3052	(A ₃₃₅)
	0.0000 ^c	NS ^d	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0.0006	0.0006	0.0432	0.0150	0.0007	
	1.0000	0.2109	0.1944	0.5572	0.5597	0.5651	0.6294	0.6964	0.4471	0.6310	0.6174	0.5306	0.5610	0.5244	IRM
		0.0208	0.0334	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	(A ₃₃₅ /A ₂₇₇)
		1.0000	0.9895	0.6651	0.1897	0.1452	0.3885	0.3941	0.7348	0.7145	0.7268	0.7915	0.6979	0.6789	a _w
			0.0000	0.0000	0.0380	NS	0.0034	0.0029	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	
			1.0000	0.6505	0.1715	0.1350	0.3076	0.3343	0.7040	0.6990	0.7215	0.7803	0.6681	0.6738	Humedad
				0.0000	NS	NS	0.0223	0.0126	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	
				1.0000	0.7606	0.7090	0.7085	0.7379	0.7072	0.8238	0.7835	0.7859	0.7696	0.6754	-K ₃₃₂
					0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	
					1.0000	0.9871	0.7037	0.7274	0.2634	0.4928	0.4180	0.3901	0.4330	0.3397	-K ₂₇₀
						0.0000	0.0000	0.0000	0.0037	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0001	
						1.0000	0.6450	0.6769	0.1967	0.4397	0.3730	0.3329	0.3646	0.3068	-K ₃₀₃
							0.0000	0.0000	0.0313	0.0000	0.0000	0.0002	0.0000	0.0007	
							1.0000	0.8927	0.4988	0.5698	0.5249	0.5285	0.5411	0.3882	Pérdida de C20:4 n-6*
								0.0000	0.0001	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0034	
								1.0000	0.5084	0.6589	0.6081	0.6154	0.6192	0.4663	Pérdida de C22:6 n-3*
									0.0001	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0003	
									1.0000	0.8031	0.8067	0.8030	0.7999	0.7356	Pérdida de color
										0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	
										1.0000	0.9550	0.9279	0.9254	0.8820	"Formación α-CE"
											0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	
										1.0000	1.0000	0.9135	0.8899	0.9033	"Formación 7β-HC"
												0.0000	0.0000	0.0000	
												1.0000	0.9219	0.8959	"Formación CT"
													0.0000	0.0000	
													1.0000	0.8455	"Formación 7-CC"
														0.0000	
														1.0000	"Formación 25-HC"

* Símbolos: IPM, intensidad de pardamiento producido por la reacción de Maillard medido como absorbancia a 420 nm; IRM, intensidad con la que se produce la reacción de Maillard medida como la relación entre las absorbancias a 335 nm y a 277 nm; a_w, actividad del agua; -K₃₃₂, incremento de la extinción específica a 232 nm; -K₂₇₀, incremento de la extinción específica a 270 nm; -K₃₀₃, incremento de la extinción específica a 303 nm; α-CE, 5,6α-epoxi-5α-colestan-3β-ol; 7β-HC, colest-5-en-3β,7β-diol; CT, 5α-colestan-3β,5,6β-triol; 7-CC, 3β-hidroxicolest-5-en-7-ona; y 25-HC, colest-5-en-3β,25-diol.

^b Coeficiente de correlación de Pearson.

^c Grado de significación. ^d No significativo. * n = 55

4.2.2.ANOVA MULTIFACTORIAL.

El ANOVA multifactorial se aplicó separadamente sobre los puntos: inicial, 0 meses ($n = 24$); SV, 5 meses ($n = 24$); CV, 5 meses ($n = 24$); SV, 10 meses ($n = 24$); y SV, 10 meses ($n = 24$). En estos casos, como es lógico, sólo se estudió la influencia de la temperatura de atomización, tipo de antioxidante y de su concentración. Los resultados obtenidos fueron similares en los 5 casos y, además, presentaron un alto nivel de concordancia con los obtenidos al aplicar esta prueba sobre el total de resultados. Este es el motivo por el cual sólo se reflejan los resultados obtenidos en este último estudio. Uno de los problemas que se presentó al aplicar el ANOVA sobre el total de resultados fue la presencia de un único punto inicial de referencia, tanto para las muestras envasadas a presión atmosférica como para las envasadas al vacío. Para evitar este problema se aplicó el ANOVA sobre el total de resultados ($n = 120$), pero estudiando sólo los siguientes factores: temperatura de atomización, tipo de antioxidante y su concentración y tiempo de envasado. Los resultados obtenidos figuran en la tabla 6. Para el estudio de los 5 factores contemplados en el diseño factorial se cogieron los resultados ($n = 96$) correspondientes a los siguientes puntos del estudio de almacenamiento: SV, 5 meses; CV, 5 meses; SV, 10 meses; y CV, 10 meses. Los resultados obtenidos figuran en la tabla 7. Se tuvieron en cuenta otras opciones para poder estudiar el total de factores considerando el punto inicial. La primera de estas opciones consistió en restar a cada uno de los puntos del estudio de almacenamiento el punto inicial y, a continuación, aplicar el ANOVA multifactorial sobre estas diferencias ($n = 96$). La segunda opción consistió en crear un nuevo factor que consideraba conjuntamente tiempo y condiciones de almacenamiento y aplicar el ANOVA multifactorial sobre el total de resultados ($n = 120$). Los resultados obtenidos aplicando esta segunda opción figuran en la tabla 8; no obstante, los obtenidos aplicando la primera opción no se reflejaron en este trabajo ya que no aportaron ninguna información que no derivará de los resultados de las tablas 6, 7 y 8 y, además, con esta opción se presentaron problemas de resultados negativos para ciertas respuestas (IPM e IRM).

Para estudiar como influían los diferentes factores sobre la pérdida de C20:4 n-6 y C20:6 n-3 se cogieron los resultados de estas dos repuestas para los diferentes huevos en polvo almacenados durante 10 meses ($n = 44$) y se aplicó el ANOVA multifactorial. Los resultados obtenidos figuran en la tabla 9.

Tabla 6-Grado de significación para los factores e interacciones que influyen significativamente sobre alguna de las repuestas, resultante de aplicar el ANOVA multifactorial sobre el total de resultados (n = 120) contemplando sólo los siguientes factores, temperatura de atomización, tipo de antioxidante, concentración de antioxidante, tiempo de almacenamiento y las interacciones entre factores de segundo orden.

Respuestas Factores	IPM ^a	IRM ^a	a _w ^a	Humedad	K ₂₃₂ ^a _	K ₂₇₀ ^a _	K ₃₀₃ ^a _	Pérdida de color	"Formación α-CE" ^a	"Formación 7β-HC" ^a	"Formación CT" ^a	"Formación 7-CC" ^a	"Formación 25-HC" ^a
Temperatura (A)	CS ^b	0.0000 ^f	NS ^d	NS	0.0000	0.0000	0.0000	0.0001	0.0000	0.0000	0.0001	0.0000	0.0000
Tipo antioxidante (B)	NS	0.0000	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0.0480	NS	NS	CS
Concentración antioxidante (C)	NS	0.0156	NS	NS	0.0001	0.0000	0.0000	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Tiempo de almacenamiento (D)	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0009	0.0265	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Interacciones entre factores													
AxB	NS	NS	NS	NS	NS	0.0882	0.0476	0.0902	NS	NS	NS	NS	NS
AxC	0.0077	0.0000	NS	NS	0.0020	0.0000	0.0000	NS	0.0019	0.0000	NS	NS	NS
AxD	NS	NS	NS	NS	NS	0.0027	0.0024	NS	0.0439	0.0161	NS	0.0157	0.0446
BxC	0.0233	0.0000	NS	NS	CS	0.0000	0.0002	NS	NS	NS	NS	NS	NS
BxD	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
CxD	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

^a Símbolos: IPM, intensidad de pardeamiento producido por la reacción de Maillard medido como absorbancia a 420 nm; IRM, intensidad con la que se produce la reacción de Maillard medida como la relación entre las absorbancias a 335 nm y a 277 nm; a_w, actividad del agua; _ K₂₃₂, incremento de la extinción específica a 232 nm; _ K₂₇₀, incremento de la extinción específica a 270 nm; _ K₃₀₃, incremento de la extinción específica a 303 nm; α-CE, 5,6α-epoxi-5α-colestan-3β-ol; 7β-HC, colest-5-en-3β,7β-diol; CT, 5α-colestan-3β,5,6β-triol; 7-CC, 3β-hidroxicolest-5-en-7-ona; y 25-HC, colest-5-en-3β,25-diol.

^b Casi significativo (grado de significación ≤ 0.1).

^c Grado de significación.

^d No significativo.

Tabla 7-Grado de significación para los factores e interacciones que influyen significativamente sobre alguna de las repuestas, resultante de aplicar el ANOVA multifactorial sobre todos los resultados, excepto los del punto inicial del estudio de almacenamiento (n = 96), contemplando todos los factores y sus interacciones de segundo orden.

Respuestas Factores	IPM ^a	IRM ^a	a _w ^a	Humedad	K ₃₃₂ ^a	K ₂₇₀ ^a	K ₃₀₈ ^a	Pérdida de color	"Formación α-CE" ^{ns}	"Formación 7β-HC" ^{ns}	"Formación CT" ^{ns}	"Formación 7-CC" ^{ns}	"Formación 25-HC" ^{ns}
Temperatura (A)	0.0006 ^b	0.0000	0.0386	0.0123	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Tipo antioxidante (B)	0.0369	0.0000	NS ^c	NS	CS	0.0414	NS	NS	0.0308	0.0004	0.0104	NS	0.0050
Concentración antioxidante (C)	0.0074	CS ^d	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0056	NS	NS	NS	NS	NS
Tiempo de almacenamiento (D)	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	NS	NS	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Condiciones de almacenamiento (E)	0.0000	0.0129	0.0000	0.0000	0.0000	NS	NS	0.0120	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Interacciones entre factores													
AxB	NS	NS	NS	0.0435	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	CS	NS
AxC	0.0016	0.0000	CS	0.0000	0.0001	0.0000	0.0000	NS	0.0000	0.0000	0.0034	0.0414	CS
AxD	NS	NS	NS	NS	NS	0.0017	0.0015	0.0000	NS	NS	NS	NS	NS
AxE	0.0004	0.0003	NS	NS	0.0053	NS	NS	CS	0.0028	0.0118	0.0012	0.0324	NS
BxC	0.0040	0.0000	NS	NS	0.0030	0.0006	0.0044	NS	NS	0.0274	NS	NS	NS
BxD	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
BxE	NS	CS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0.0112	NS	NS	NS	NS
CxD	NS	NS	CS	NS	NS	NS	NS	NS	0.0003	NS	CS	NS	0.0257
CxE	NS	NS	0.0205	0.0131	NS	NS	NS	NS	0.0398	CS	0.0415	NS	CS
DxE	NS	0.0241	0.0000	0.0000	0.0038	NS	NS	0.0048	0.0000	0.0002	0.0011	0.0064	0.0048

^a Símbolos: IPM, intensidad de pardeamiento producido por la reacción de Maillard medida como absorbancia a 420 nm; IRM, intensidad con la que se produce la reacción de Maillard medida como la relación entre las absorbancias a 335 nm y a 277 nm; a_w, actividad del agua; K₃₃₂, incremento de la extinción específica a 232 nm; K₂₇₀, incremento de la extinción específica a 270 nm; K₃₀₈, incremento de la extinción específica a 303 nm; α-CE, 5,6α-epoxi-5α-colestan-3β-ol; 7β-HC, colest-5-en-3β,7β-diol; CT, 5α-colestan-3β,5,6β-triol; 7-CC, 3β-hidroxicolest-5-en-7-ona; y 25-HC, colest-5-en-3β,25-diol.

^b Grado de significación.

^c No significativo.

^d Casi significativo (grado de significación ≤ 0.1).

Tabla 8-Grado de significación para los factores e interacciones que influyen significativamente sobre alguna de las repuestas, resultante de aplicar el ANOVA multifactorial sobre todos los resultados ($n = 120$) contemplando todos los factores, pero tiempo y condiciones de almacenamiento como un solo factor, y sus interacciones de segundo orden.

Respuestas Factores	IPM*	IRM*	a_w *	Humedad	$-K_{232}$ *	$-K_{270}$ *	$-K_{305}$ *	Pérdida de color	Formación α -CE**	Formación 7 β -HC**	Formación CT**	Formación 7-CC**	Formación 25-HC**
Temperatura (A)	0.0041 ^b	0.0000	NS	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Tipo antioxidante (B)	NS	0.0000	NS ^c	NS	NS	CS	NS	NS	0.0069	0.0002	0.0051	NS	0.0032
Concentración antioxidante (C)	0.0429	0.0052	0.0002	0.0000	0.0000	0.0000	0.0065	NS	NS	NS	CS	NS	NS
Tiempo y condiciones de almacenamiento (D)	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0024	NS	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Interacciones entre factores													
AxB	NS	NS	NS	CS ^d	NS	CS	0.0146	NS	NS	NS	NS	0.0424	NS
AxC	0.0026	0.0000	CS	0.0000	0.0000	0.0000	NS	0.0000	0.0000	0.0010	0.0010	0.0426	0.0289
AxD	0.0033	0.0000	0.0206	0.0341	0.0013	0.0114	0.0028	0.0001	0.0000	0.0000	0.0000	0.0001	0.0227
BxC	0.0100	0.0000	NS	NS	0.0012	0.0000	0.0004	0.0793	CS	0.0281	NS	NS	NS
BxD	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0.0032	NS	NS	NS	NS
CxD	NS	NS	0.0011	NS	NS	NS	NS	NS	0.0000	NS	0.0010	0.0739	0.0042

* Símbolos: IPM, intensidad de pardamiento producido por la reacción de Maillard medido como absorbancia a 420 nm; IRM, intensidad con la que se produce la reacción de Maillard medida como la relación entre las absorbancias a 335 nm y a 277 nm; a_w , actividad del agua; $-K_{232}$, incremento de la extinción específica a 232 nm; $-K_{270}$, incremento de la extinción específica a 270 nm; $-K_{305}$, incremento de la extinción específica a 303 nm; α -CE, 5,6 α -epoxi-5 α -colestan-3 β -ol; 7 β -HC, colest-5-en-3 β ,7 β -diol; CT, 5 α -colestan-3 β ,5,6 β -triol; 7-CC, 3 β -hidroxicolest-5-en-7-onas; y 25-HC, colest-5-en-3 β ,25-diol.

^b Grado de significación.

^c No significativo.

^d Casi significativo (grado de significación ≤ 0.1)

Tabla 9-Grado de significación para los factores e interacciones que influyen significativamente sobre la pérdida de C20:4 n-6 ó C20:6 n-3, resultante de aplicar el ANOVA multifactorial sobre los resultados obtenidos para el huevo en polvo almacenado 10 meses (n = 44) contemplando todos los factores y sus interacciones de segundo orden, excepto como es lógico, el tiempo de almacenamiento.

Respuestas	Pérdida de C20:4 n-6	Pérdida de C22:6 n-3
Factores		
Temperatura (A)	0.0000 ^a	0.0000
Tipo antioxidante (B)	0.0349	NS ^b
Concentración antioxidante (C)	NS	NS
Condiciones de almacenamiento (D)	0.0006	0.0003
Interacciones entre factores		
AxB	NS	NS
AxC	NS	0.0161
AxD	CS ^d	NS
BxC	NS	NS
BxD	NS	NS
CxD	NS	NS

^a Grado de significación.

^b No significativo.

^d Casi significativo (grado de significación ≤ 0.1)

La evolución de los distintos respuestas a lo largo del estudio de almacenamiento se puede observar en las tablas 3 y 4, en donde figuran los resultados medios de estas respuestas en función de los diferentes factores y de sus interacciones.

IPM e IRM. Como podemos observar en la tabla 7 el tiempo y las condiciones de envasado influyen muy significativamente sobre el valor de IPM, mientras que la temperatura de atomización lo hace en menor grado. En la tabla 3, vemos que esta respuesta aumenta con el tiempo de almacenamiento y con la temperatura de atomización, lo cual concuerda con los resultados obtenidos para IRM. No obstante, como podemos observar en la tabla 3, IPM e IRM se comportan diferente en cuanto se refiere a las condiciones de envasado. Los valores de IPM son más altos cuando el envasado se realiza al vacío y en ausencia de luz; mientras que para IRM son más elevados cuando el envasado se realiza a presión atmosférica y en presencia de luz. Cabe comentar que IRM depende de forma estadísticamente significativa del tipo de antioxidante, lo cual es lógico teniendo en cuenta que GP presenta un máximo de absorción a 273 nm y que se ha comprobado que es parcialmente extraído con tricloroacético al 10 %. De esta manera, IRM (A_{335}/A_{227}) posee un valor medio más elevado para la muestras con PA + dl- α -T que para las que contienen GP. IRM también depende muy significativamente de las interacciones entre temperatura y concentración de antioxidante; y entre tipo de antioxidante y su concentración. No obstante, los resultados obtenidos para ambas interacciones vienen condicionados, como indican los valores medios de la tabla 3, por la absorción que presenta el GP a 273 nm. Así, por ejemplo, en las muestras que contienen GP el valor de IRM, lógicamente, disminuye con la concentración de antioxidante; mientras que en las muestras que contienen la mezcla sinérgica PA + dl- α -T aumenta ligeramente.

Actividad del agua y humedad. La actividad del agua es una respuesta que entre los márgenes correspondientes a las muestras estudiadas presenta una relación lineal muy significativa con la humedad ($r = 0.9895$, tabla 5) y, por tanto, es lógico que estas dos respuestas presenten comportamientos similares y dependan de los mismos factores. Los factores que determinan más significativamente el valor de estas dos respuestas son el tiempo y las condiciones de almacenamiento. La interacción de estos dos factores también influye muy significativamente sobre el valor de estas respuestas. En la tabla 3 se observa que los valores medios de estas respuestas aumentan claramente con el tiempo de almacenamiento y que para las muestras envasadas a presión atmosférica son mucho mayores (figura 5).

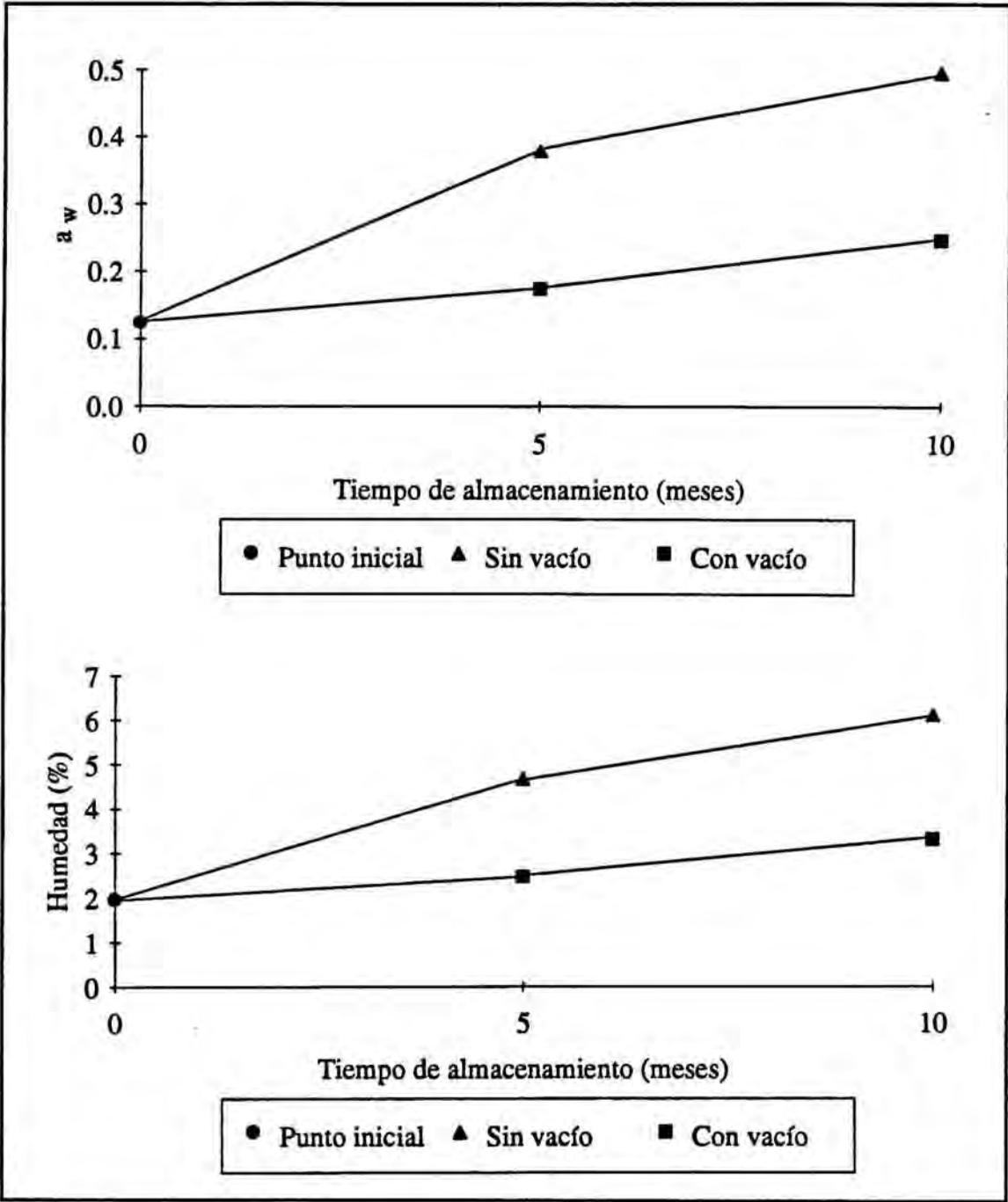


Figura 5-Evolución de la a_w y de la humedad en función del tiempo y las condiciones de almacenamiento.

Otro factor que influye significativamente sobre estas respuestas es la temperatura de atomización. En la tabla 3 se puede observar que a mayor temperatura de atomización el incremento de la humedad durante el almacenamiento es ligeramente menor, pero el de la

a_w es ligeramente mayor. La explicación a esta diferencia en el comportamiento de estas respuestas frente a la temperatura de atomización se puede explicar fácilmente, pues, una mayor temperatura de atomización implica la obtención de un producto más seco y con menor a_w , que, por otra parte, captará más fácilmente agua y que, con el tiempo, presentará una mayor actividad del agua (figura 6), al ser el agua captada más libre.

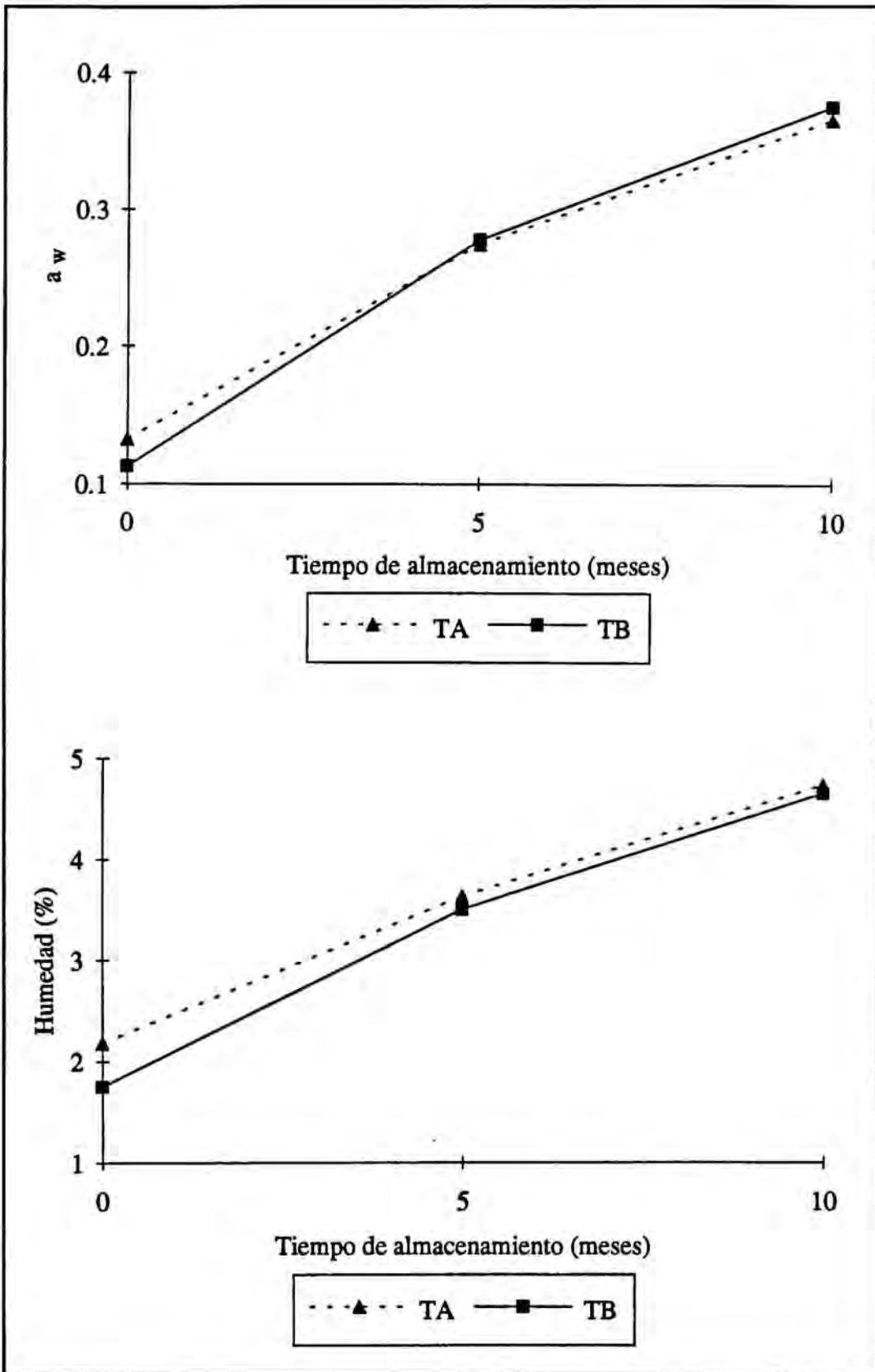


Figura 6-Evolución de la a_w y de la humedad a lo largo del estudio de almacenamiento en función de la temperatura de atomización.

En esta figura se observa, que con el tiempo, la humedad crece más para el huevo en polvo obtenido a alta temperatura, lo cual lógicamente implica también un mayor aumento de la a_w para este producto. Otro factor que influye significativamente en los valores de a_w y humedad es la concentración de antioxidante. En la tabla 3 se puede observar un aumento paralelo entre la concentración de antioxidante y los valores de a_w y humedad.

También influye significativamente sobre los valores de estas respuestas la interacción entre temperatura de atomización y concentración de antioxidante.

Dentro de las extinciones específicas podemos diferenciar como ya hemos dicho la K_{232} de la K_{270} y la K_{303} . La K_{232} depende muy significativamente de la temperatura, concentración de antioxidante y tiempo y condiciones de almacenado. En la tabla 3, se puede observar que el valor medio de esta respuesta aumenta con la temperatura de atomización, con el tiempo de almacenamiento y con el envasado de las muestras a presión atmosférica (figura 7).

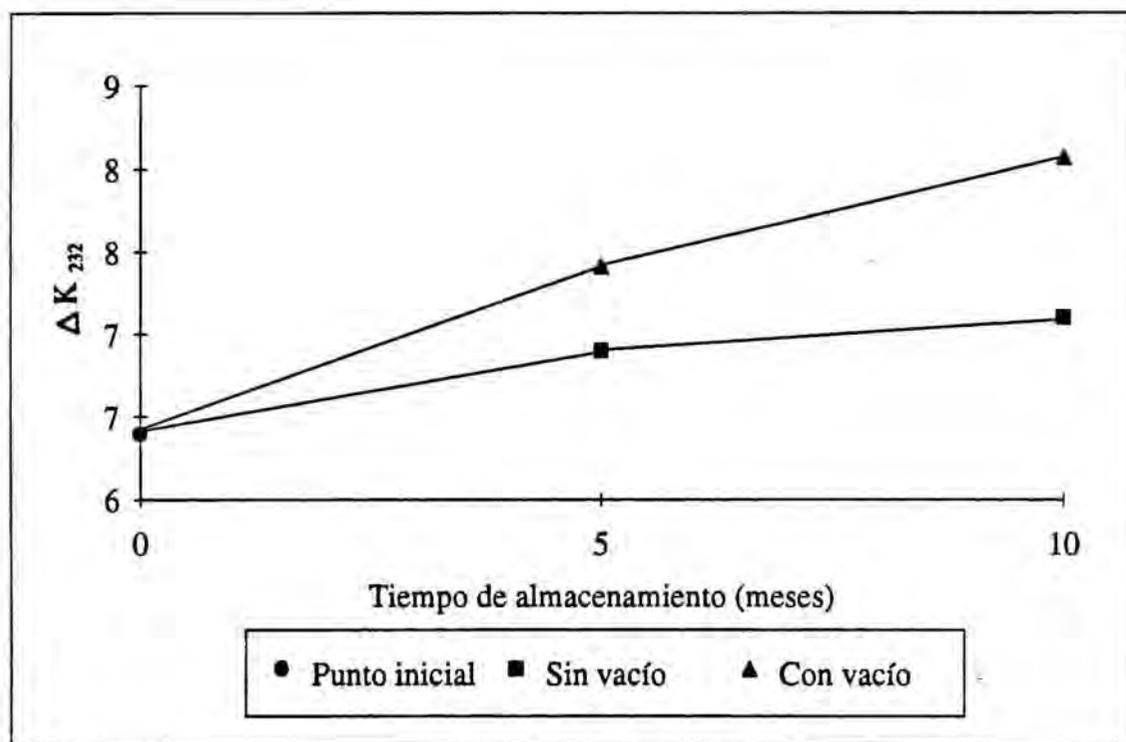


Figura 7-Evolución de la K_{232} a lo largo del estudio de almacenamiento en función de las condiciones de envasado.

Según esto, la degradación oxidativa del huevo en polvo viene favorecida por la obtención de este producto a elevadas temperaturas de atomización y por el almacenamiento del producto durante largos períodos de tiempo. No obstante, esta oxidación se evita con el envasado al vacío del producto en ausencia de luz. Además de estos factores también influyen muy significativamente la interacción entre temperatura de atomización y concentración de antioxidante (figura 8).

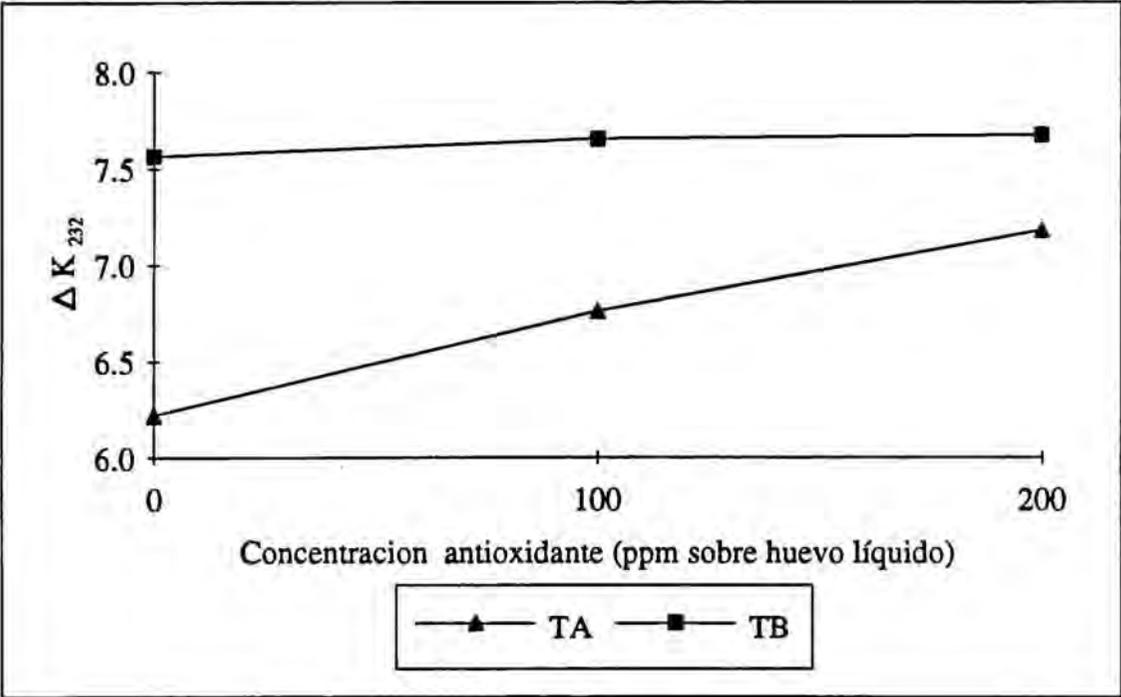


Figura 8-Influencia de la interacción entre temperatura de atomización y concentración de antioxidante sobre el valor de la K_{232} .

La K_{270} y la K_{303} dependen significativamente de la temperatura de atomización, de la concentración de antioxidante y de la interacción entre estos dos factores. En la tabla 3 se observa que los valores medios de estas dos extinciones específicas crecen con la temperatura de atomización. Para estas dos respuestas el aumento en función del tiempo de conservación y del tipo de envasado no es significativo, cuando se trabaja sin tener en cuenta el punto inicial (tabla 7), pero si lo es cuando se tiene en cuenta este punto (tablas 6 y 8). Este aumento sigue un patrón similar al de la K_{232} (figura 9).

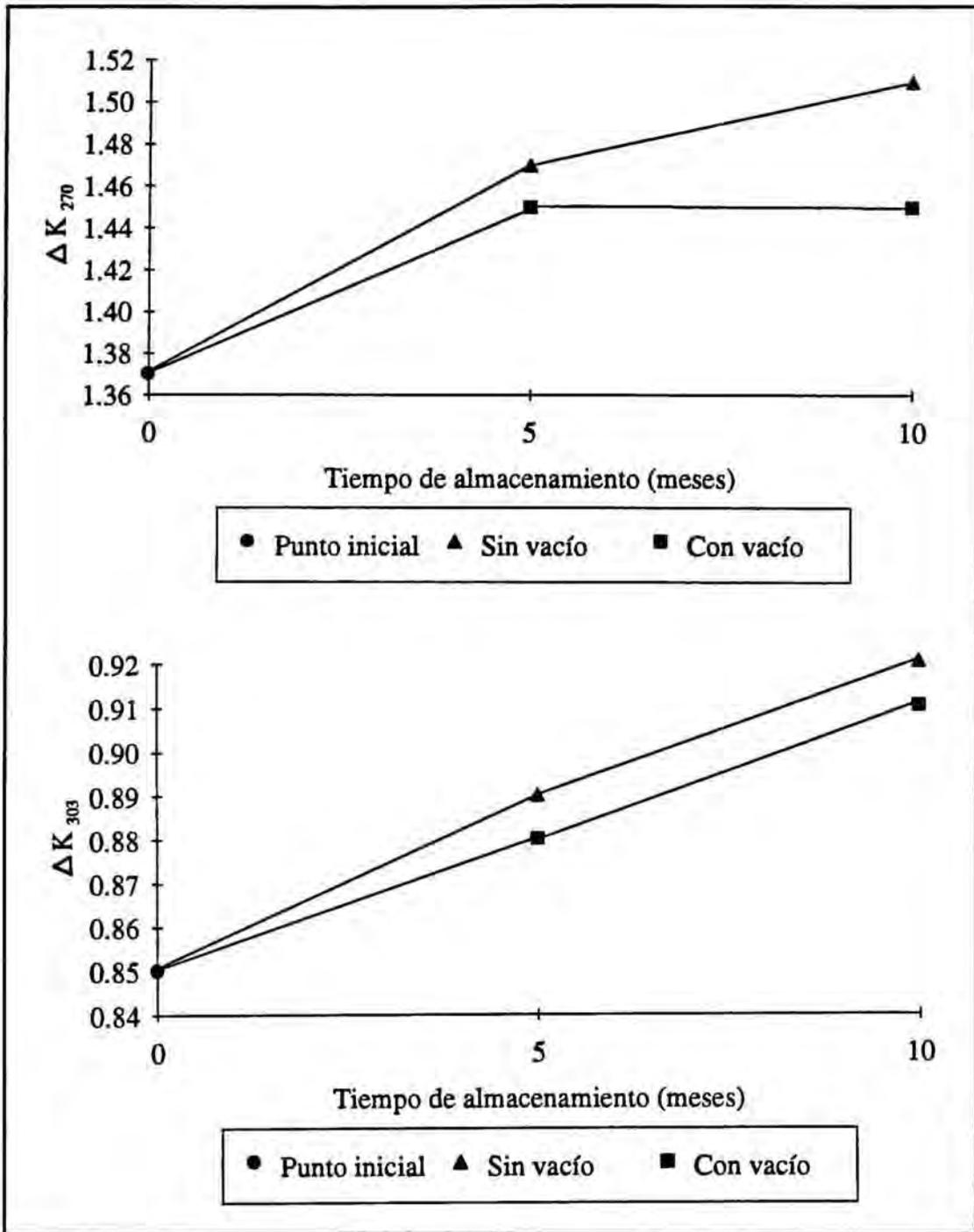


Figura 9-Evolución de la K_{270} y de la K_{303} a lo largo del estudio de almacenamiento en función de las condiciones de envasado.

Sobre la **pérdida de color** influyen significativamente la temperatura de atomización, la concentración de antioxidante y el tiempo y las condiciones de almacenamiento. La pérdida

de color no depende del tipo de antioxidante utilizado, pero si aumenta con la temperatura de atomización y tiempo de almacenamiento; y disminuye con la concentración de antioxidante y al conservarse el huevo en polvo en vacío y ausencia de luz (tabla 3) (figuras 10 y 11).

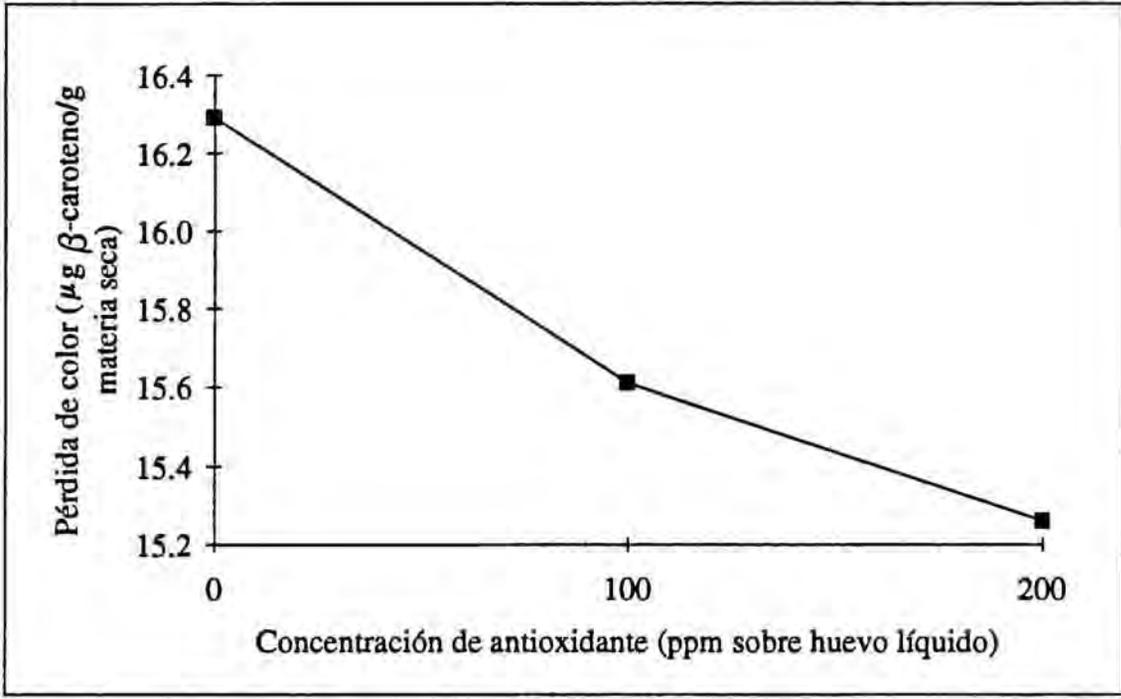


Figura 10-Pérdida de color en función de la concentración de antioxidante.

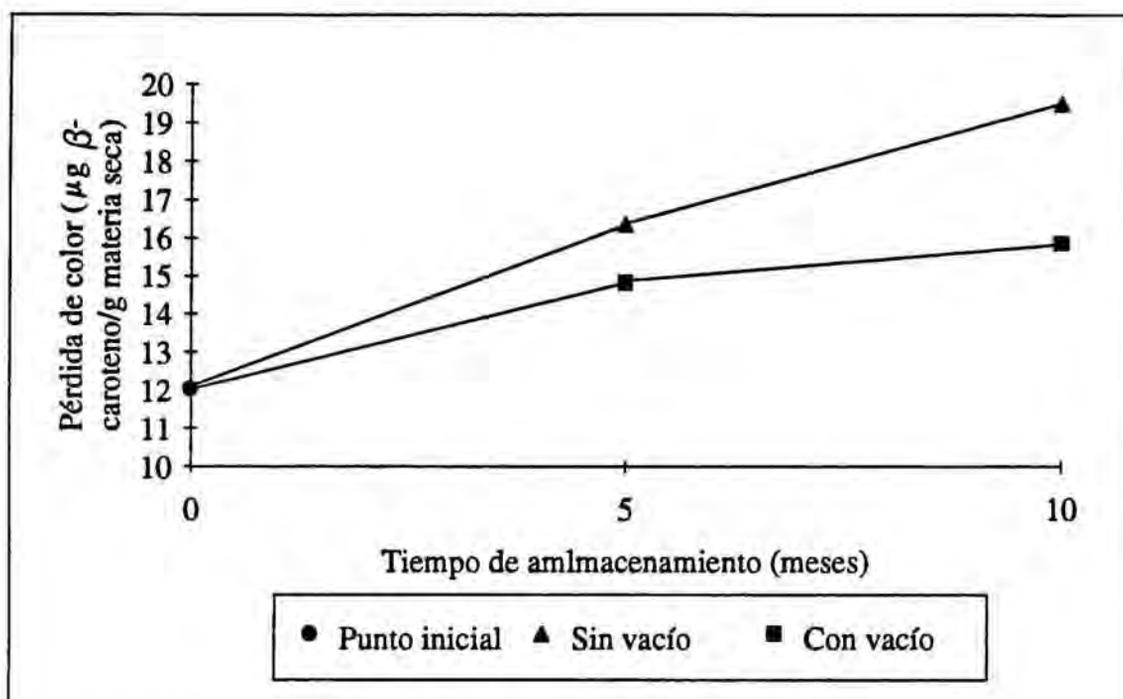


Figura 11-Evolución de la pérdida de color a lo largo del estudio de almacenamiento en función de las condiciones de envasado.

Es interesante señalar la interacción significativa entre temperatura y tipo de antioxidante según la cual el GP evitaría más eficazmente la pérdida de color a lo largo de la atomización y almacenamiento cuando la temperatura de atomización es elevada y en cambio la mezcla sinérgica PA + dl- α -T sería más eficaz cuando es baja (figura 12).

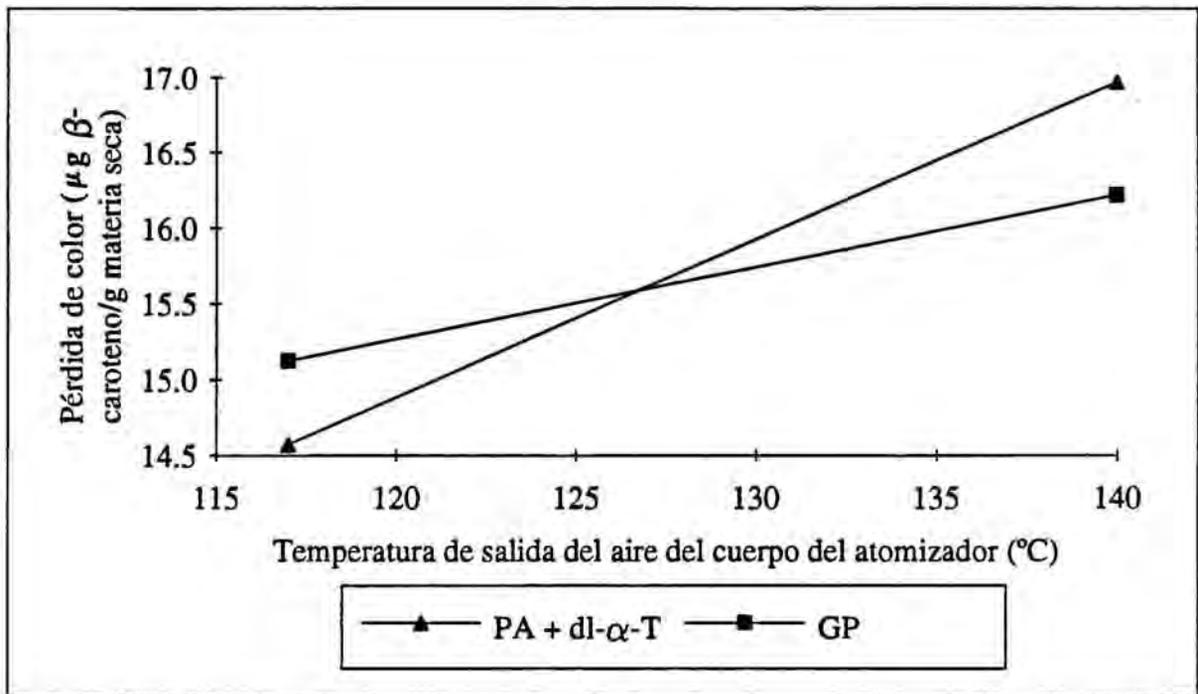


Figura 12-Influencia de la interacción entre temperatura y tipo de antioxidante sobre la pérdida de color.

También es interesante señalar la influencia significativa (tabla 7) de la interacción entre la temperatura de atomización y el tiempo de almacenamiento (figura 13).

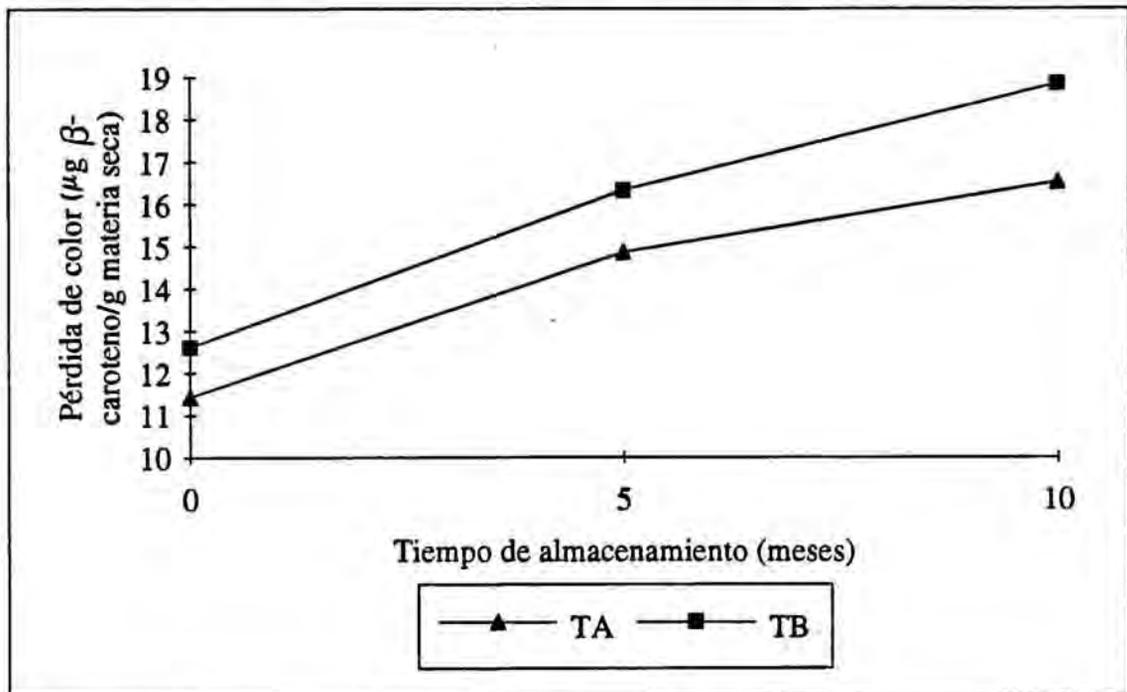


Figura 13-Influencia de la interacción entre la temperatura de atomización y tiempo de almacenamiento.

En esta gráfica se observa que el huevo producido a elevada temperatura de atomización pierde color con mayor facilidad a lo largo del proceso de almacenamiento.

Otra interacción que influye significativamente es la existente entre tipo de antioxidante y su concentración. En la tabla 3 se puede observar que el GP a altas concentraciones es más efectivo que el PA + dl- α -T (figura 14).

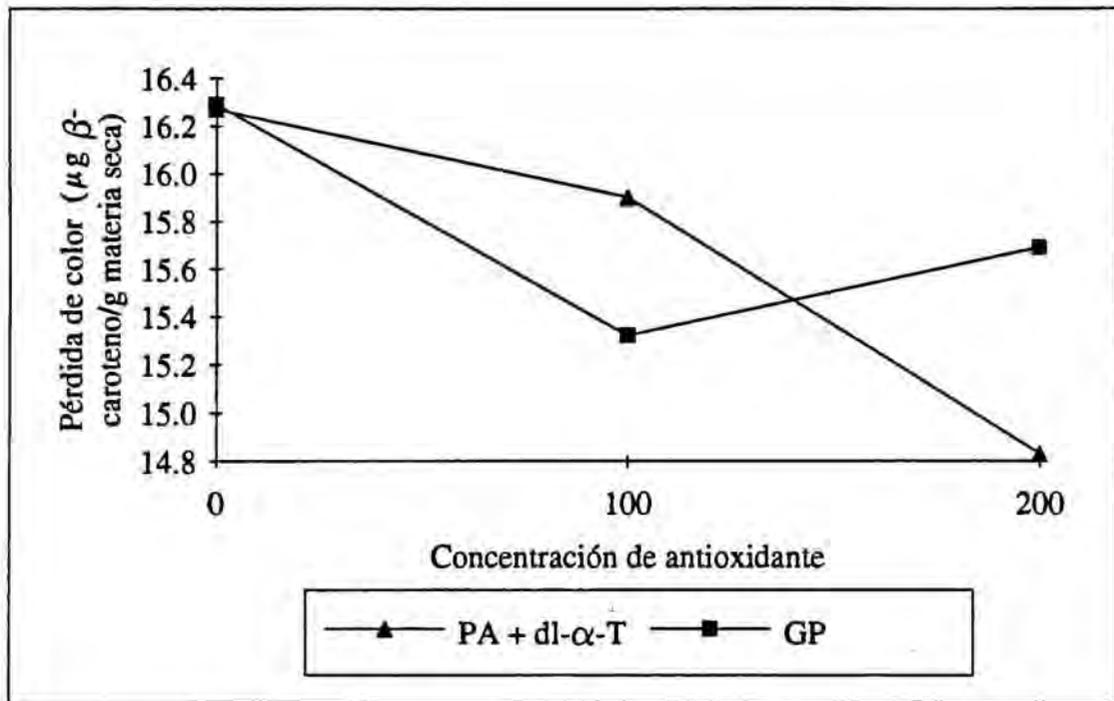


Figura 14-Influencia de la interacción entre tipo de antioxidante y su concentración sobre la pérdida de color.

Otra interacción que afecta significativamente a la pérdida de color es la que se produce entre tiempo y condiciones de almacenamiento. En la tabla 3, se observa que la pérdida de color a lo largo del tiempo es mayor cuando la muestra se encuentra envasada a presión atmosférica (figura 15).

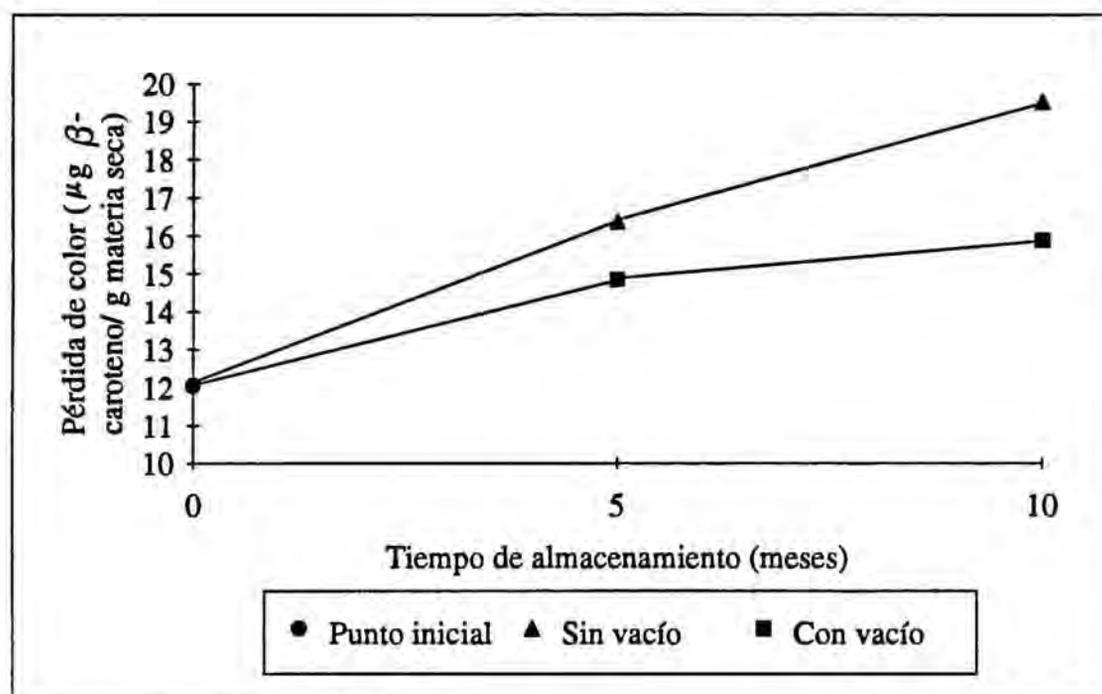


Figura 15-Evolución de la pérdida de color a lo largo del estudio de almacenamiento en función de las condiciones de envasado.

Como ya hemos comentado anteriormente, la **formación de los diferentes oxisteroles** determinados sigue un patrón parecido, con lo cual la mayoría de los factores que influyen sobre su formación son coincidentes. Así sobre todos estos derivados oxidados influye muy significativamente la temperatura de atomización y el tiempo y las condiciones de almacenamiento. Como se observa en la tabla 3, la formación de estos derivados es mayor cuanto más alta es la temperatura de atomización, cuanto más largo es el tiempo de almacenamiento y cuando las muestras se hallan envasadas a presión atmosférica (figuras 16, 17, 18, 19, 20, 21 y 22).

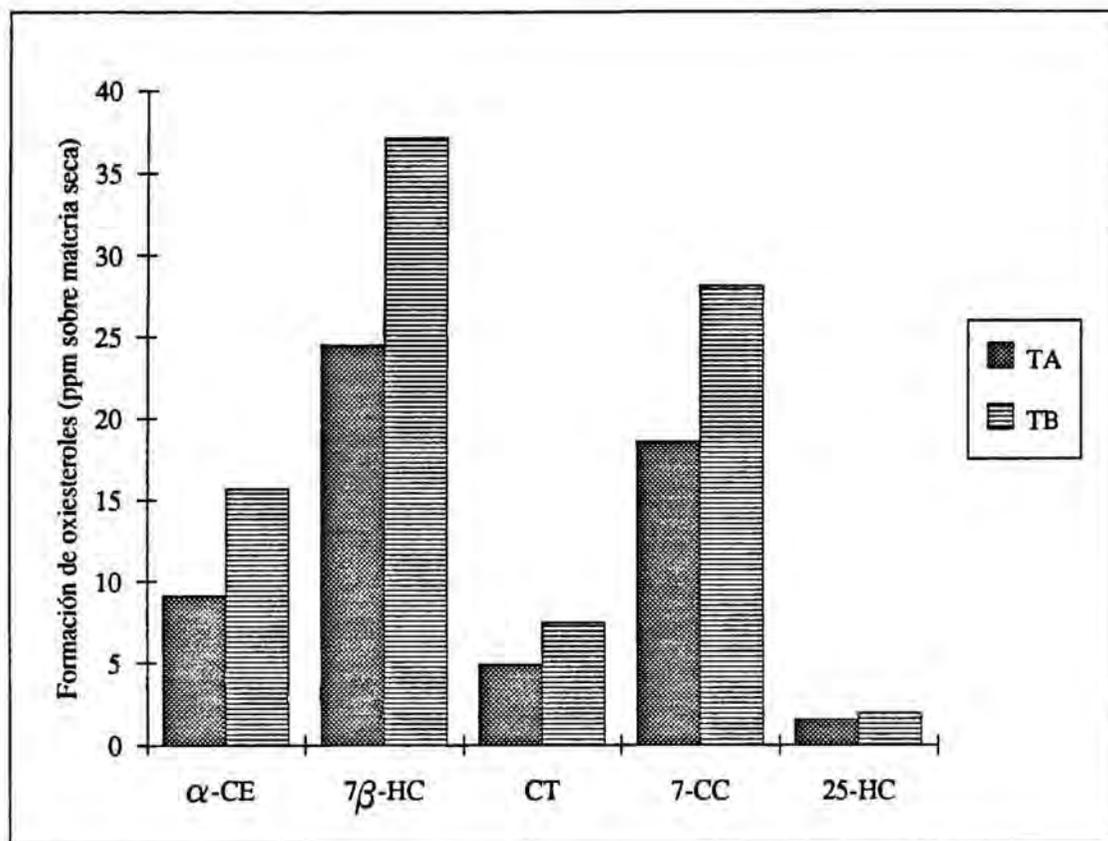


Figura 16- "Formación de los diferentes oxisteroles" en función de la temperatura de atomización.

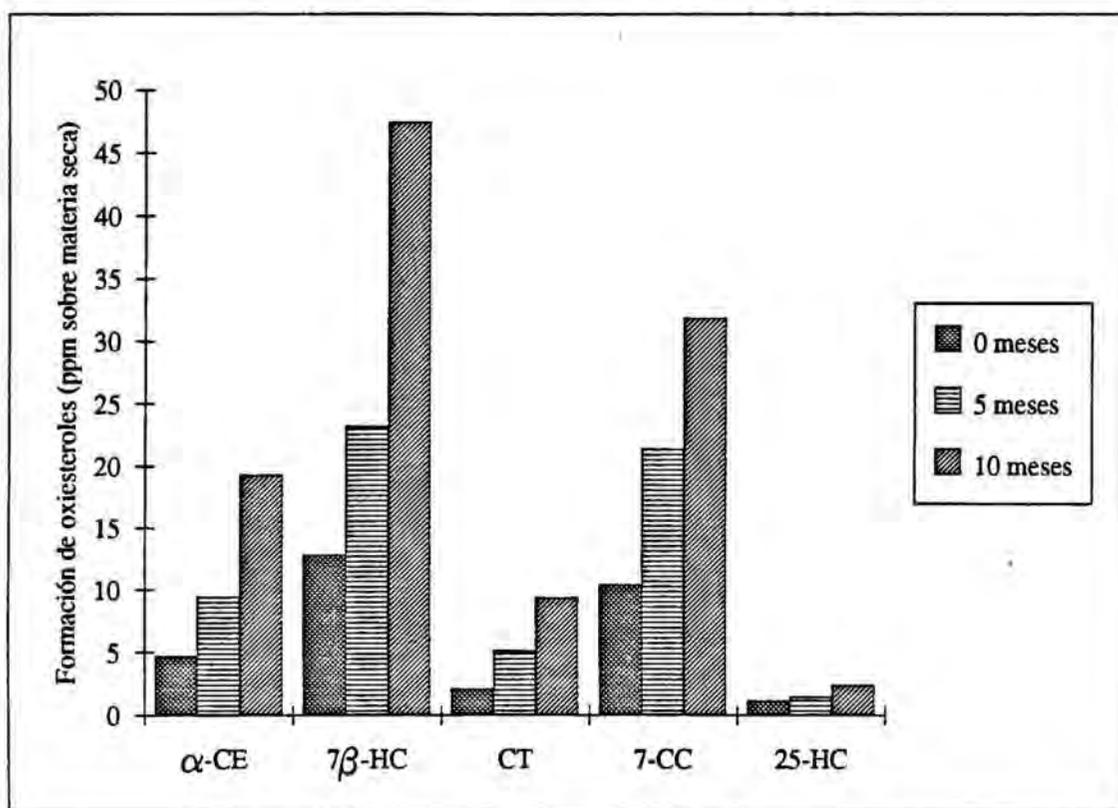


Figura 17- "Formación de los diferentes oxisteroles" a lo largo del tiempo de almacenamiento.

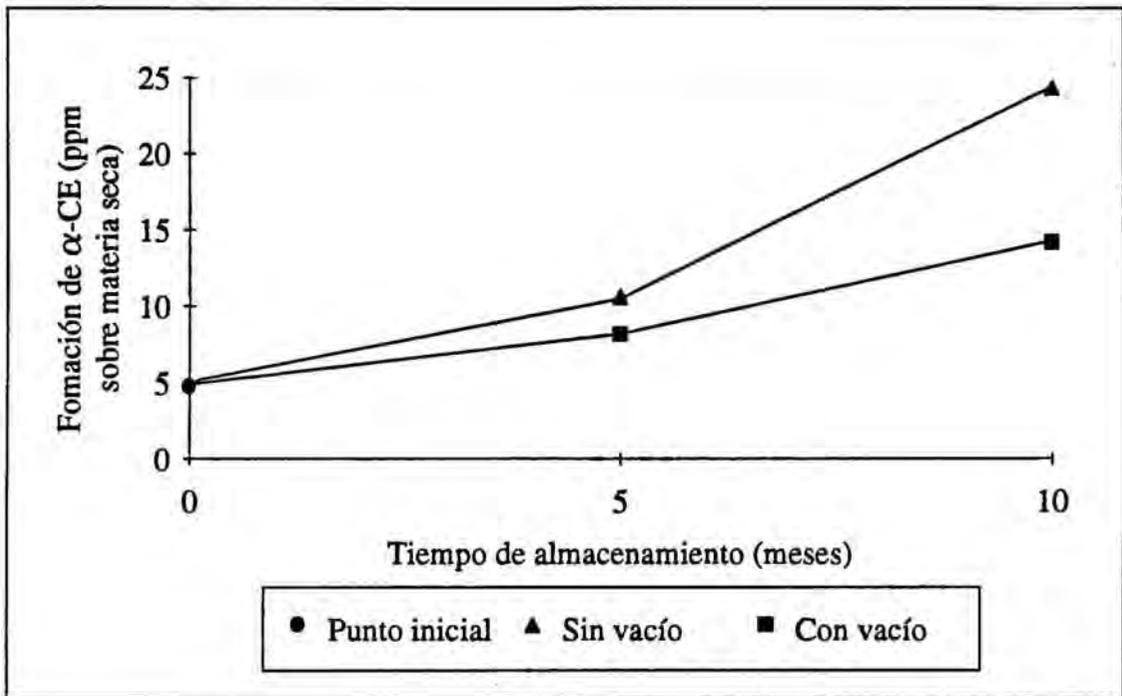


Figura 18-Evolución de la "formación de α -CE" a lo largo del estudio de almacenamiento en función de las condiciones de envasado.

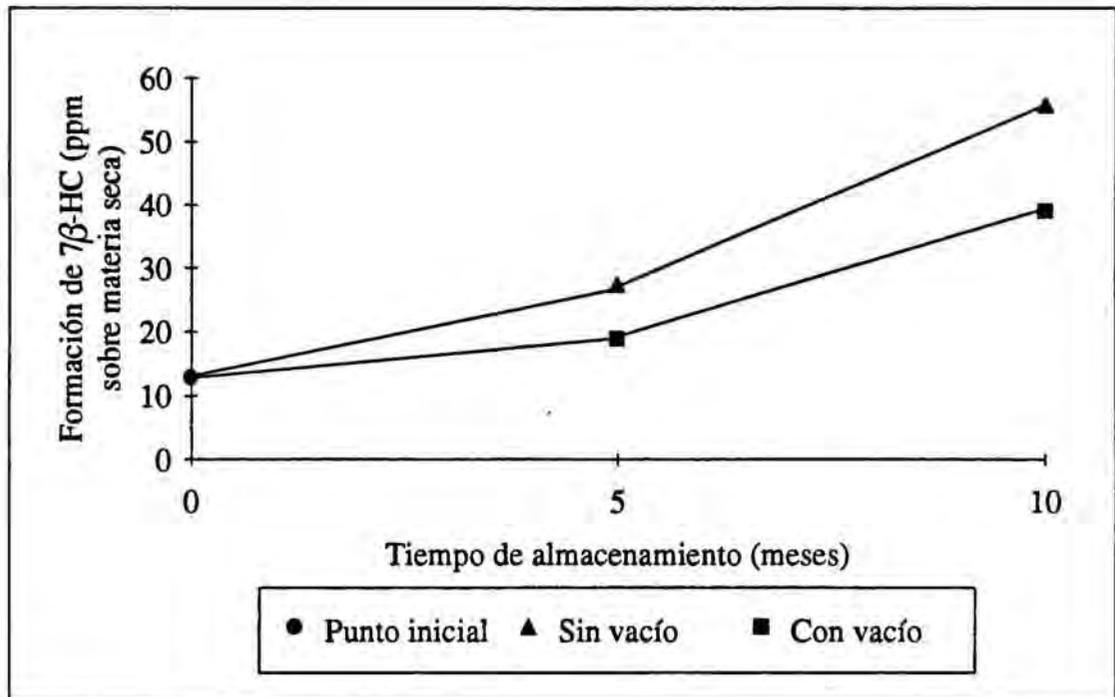


Figura 19-Evolución de la "formación de 7β -HC" a lo largo del estudio de almacenamiento en función de las condiciones de envasado.

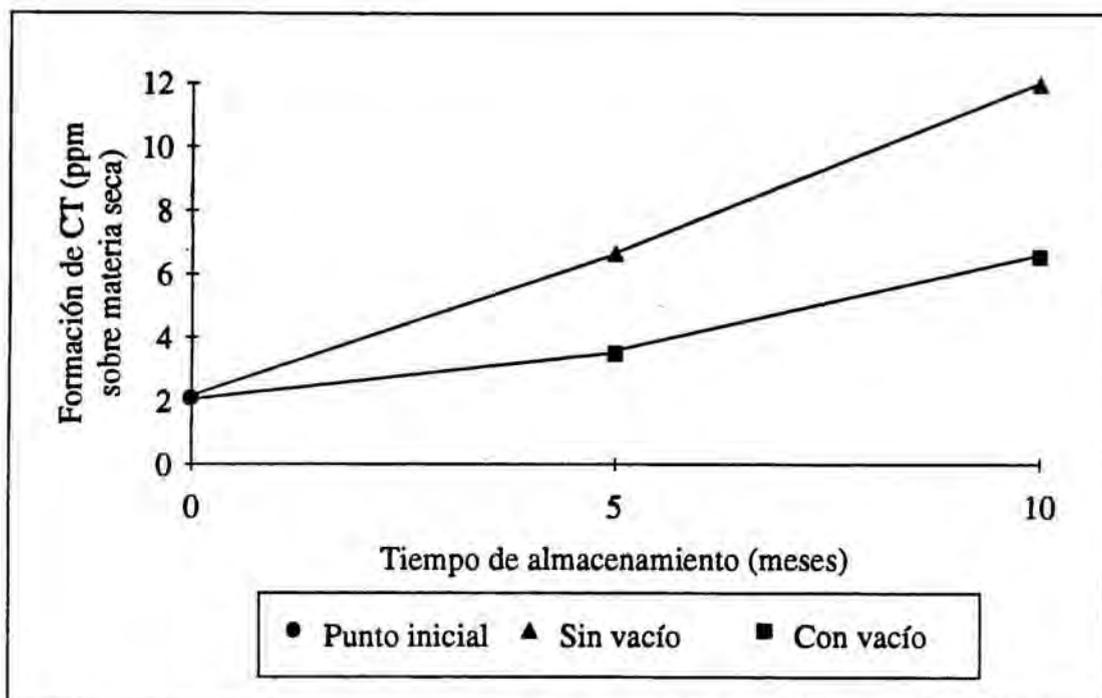


Figura 20-Evolución de la "formación de CT" a lo largo del estudio de almacenamiento en función de las condiciones de envasado.

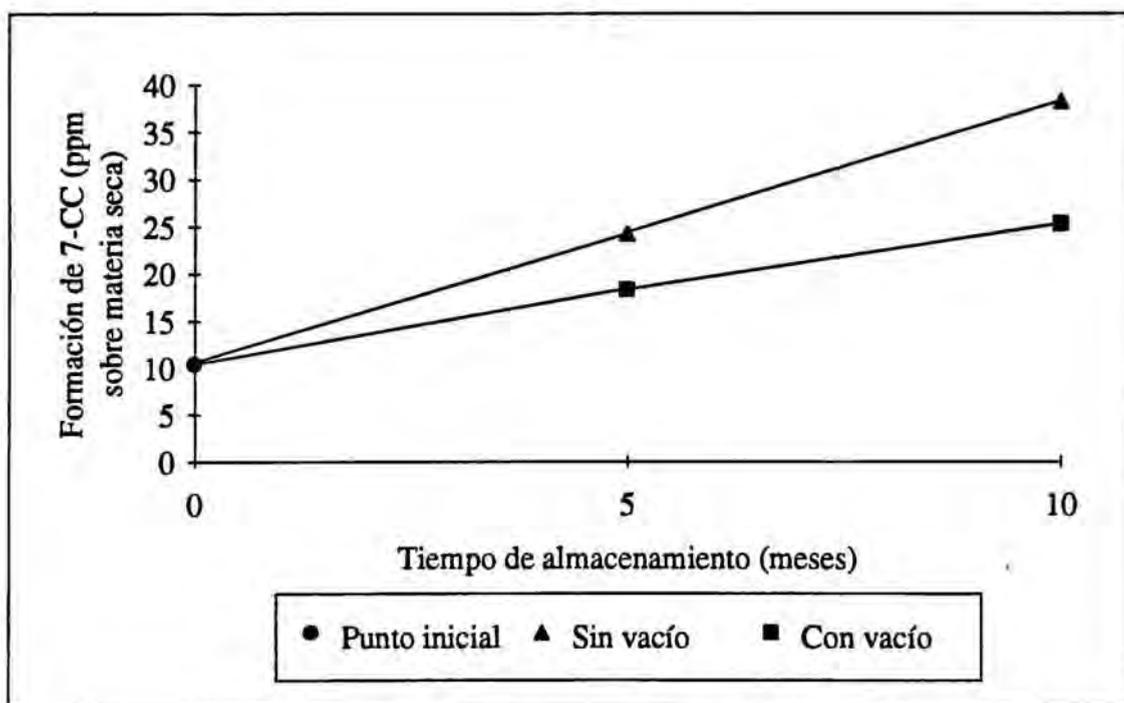


Figura 21-Evolución de la "formación de 7-CC" a lo largo del estudio de almacenamiento en función de las condiciones de envasado.

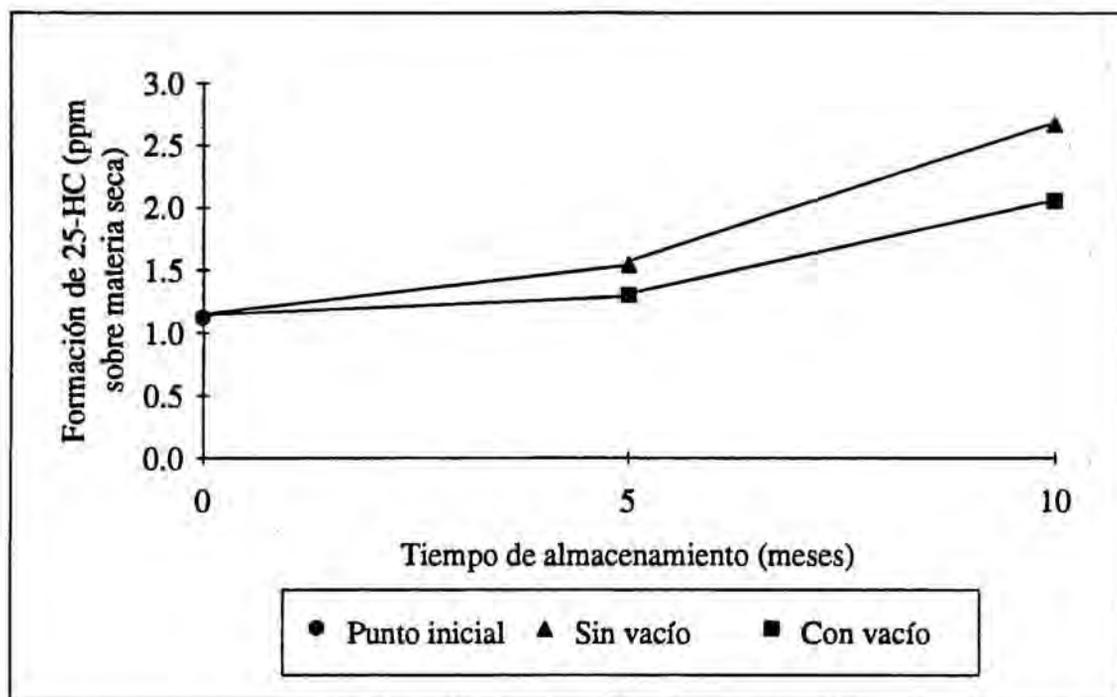


Figura 22-Evolución de la "formación de 25-HC" a lo largo del estudio de almacenamiento en función de las condiciones de envasado.

Además, sobre la formación de todos estos derivados, con la excepción del 7-CC, influye significativamente el tipo de antioxidante. En la tabla 3, se puede observar que para todos los OE la formación es menor cuando se trabaja con galato de propilo, aunque en el caso del 7-CC esta diferencia no es estadísticamente significativa. En la figura 23 se representa gráficamente la influencia del tipo de antioxidante sobre la formación de los diferentes oxisteroles. Una de las interacciones que influyen de forma interesante y significativa sobre la formación de los diferentes OE, excepto sobre el 25-HC, es la existente entre la temperatura de atomización y el tiempo de almacenamiento. En las figuras 24, 25, 26, 27 y 28 se observa que cuanto mayor es la temperatura de atomización mayor es la formación del oxisterol con el tiempo de almacenamiento. No obstante, en el caso del 25-HC esta interacción no presenta una influencia estadísticamente significativa (tabla 6).

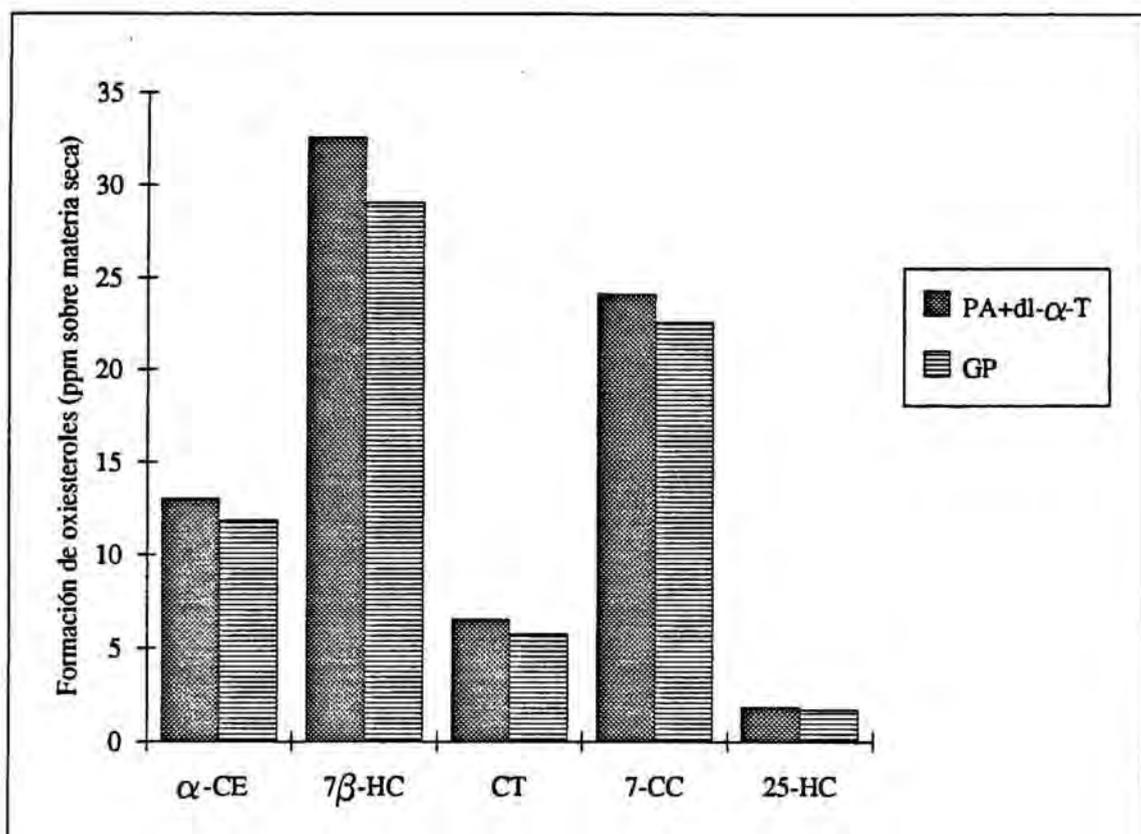


Figura 23- "Formación de los diferentes oxisteroles" en función del tipo de antioxidante utilizado.

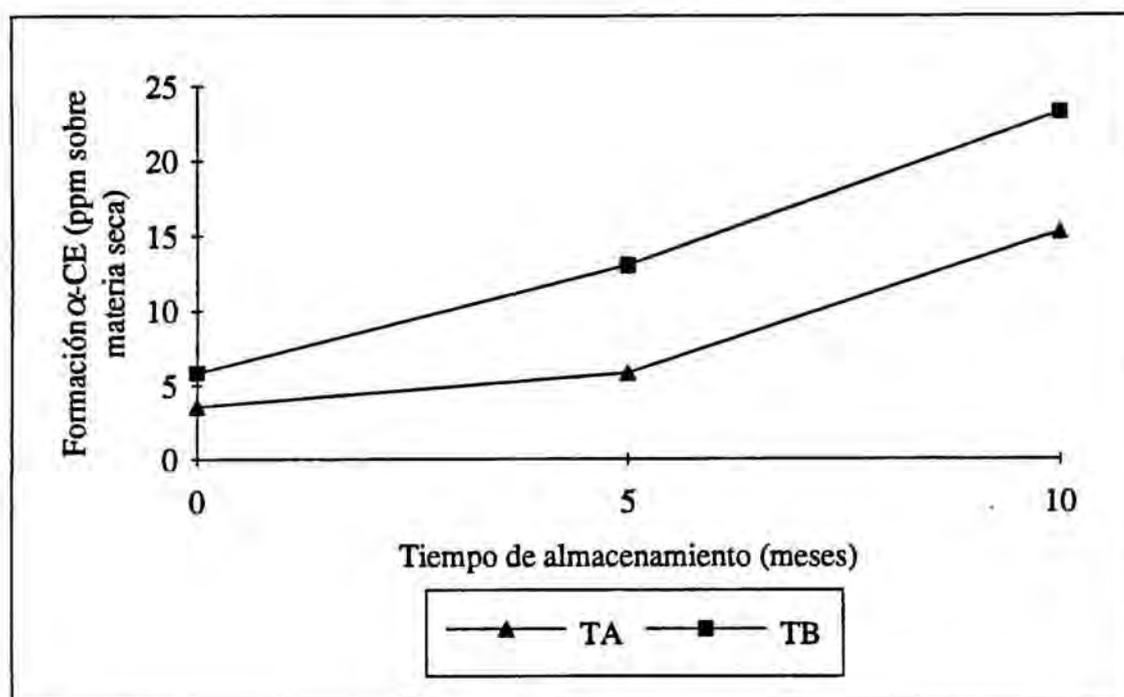


Figura 24-Evolución de la "formación de α-CE" a lo largo del estudio de almacenamiento en función de la temperatura de atomización.

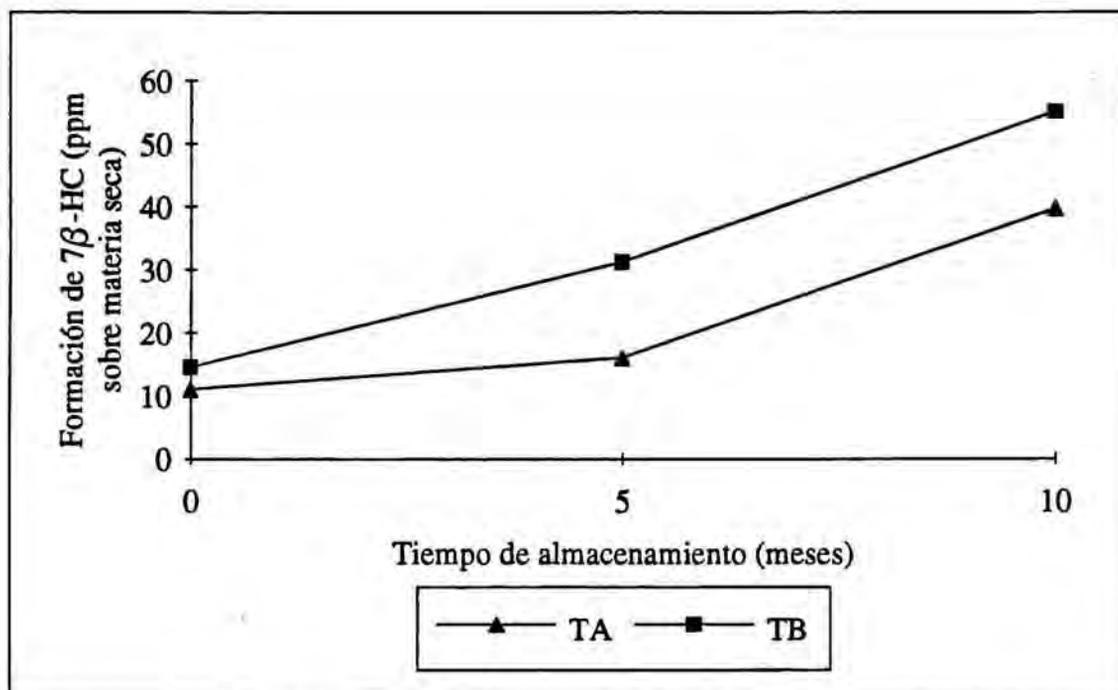


Figura 25-Evolución de la "formación de 7β-HC" a lo largo del estudio de almacenamiento en función de la temperatura de atomización.

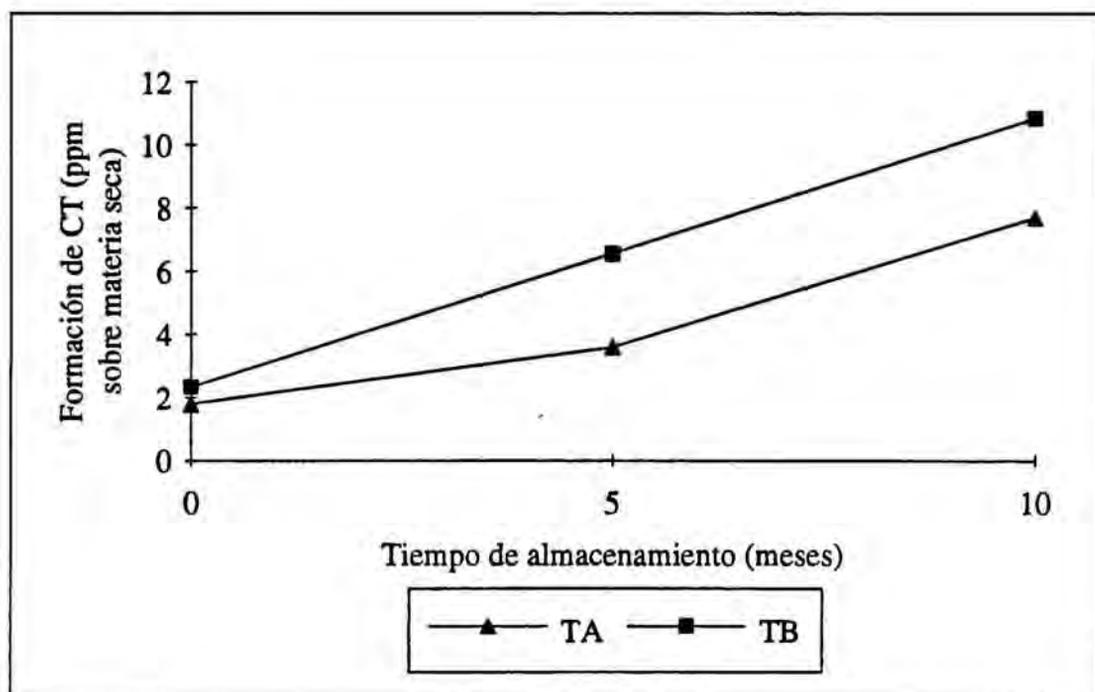


Figura 26-Evolución de la "formación de CT" a lo largo del estudio de almacenamiento en función de la temperatura de atomización.

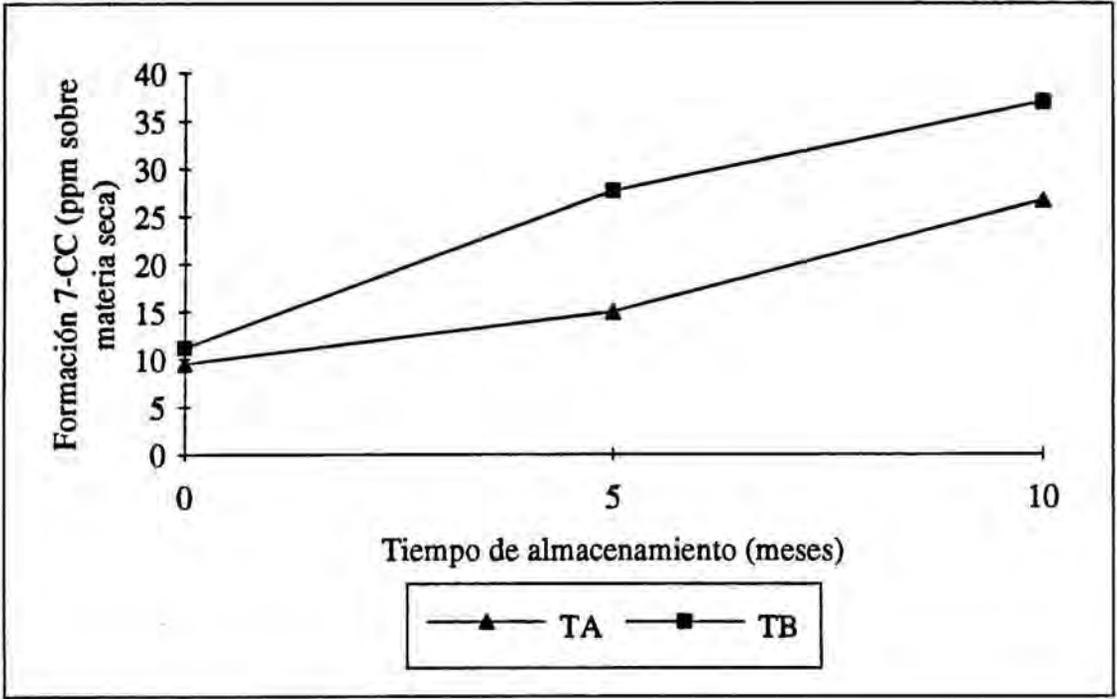


Figura 27-Evolución de la "formación de 7-CC" a lo largo del estudio de almacenamiento en función de la temperatura de atomización.

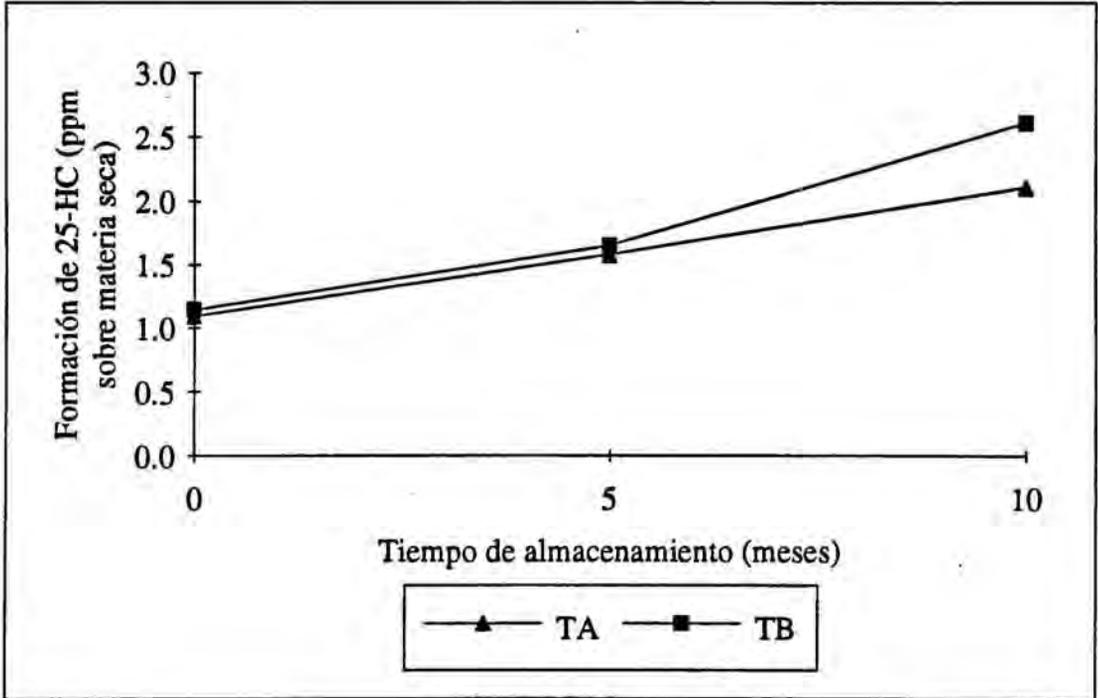


Figura 28-Evolución de la "formación de 25-HC" a lo largo del estudio de almacenamiento en función de la temperatura de atomización.

Otra interacción que influye significativamente de una forma interesante sobre la formación de OE es la existente entre tiempo y condiciones de almacenamiento. En las figuras 29, 30, 31, 32 y 33 se observa que a medida que pasa el tiempo el envasado al vacío evita más eficazmente la formación de OE que el envasado a presión atmosférica.

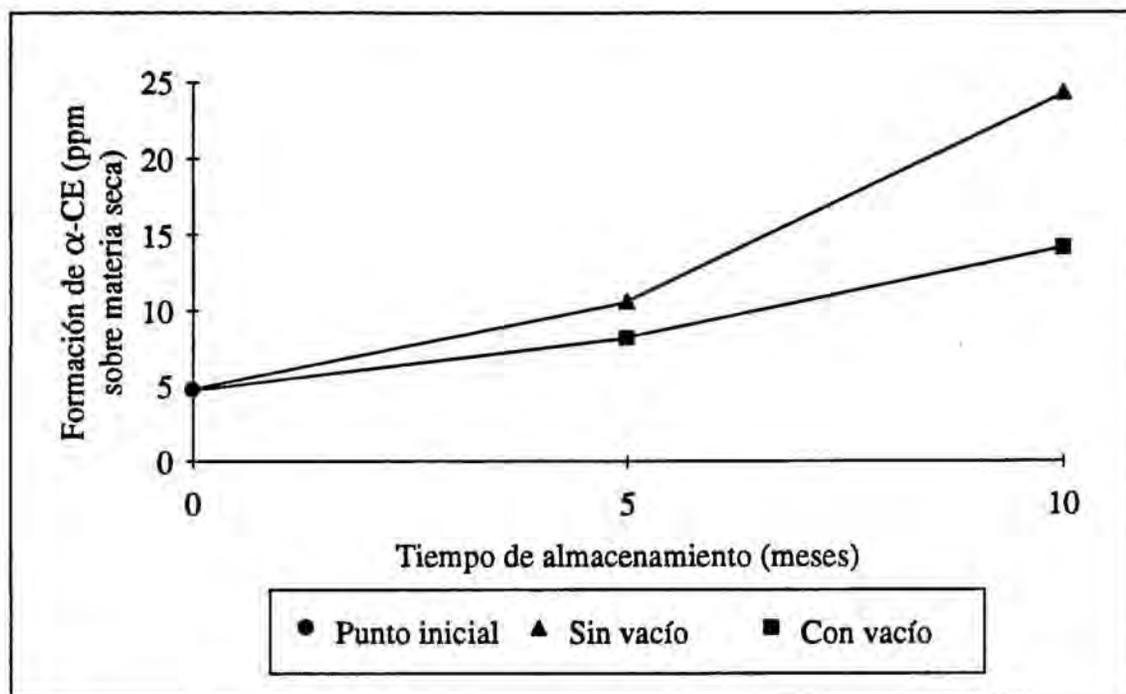


Figura 29-Evolución de la "formación de α -CE" a lo largo del estudio de almacenamiento en función de las condiciones de envasado.



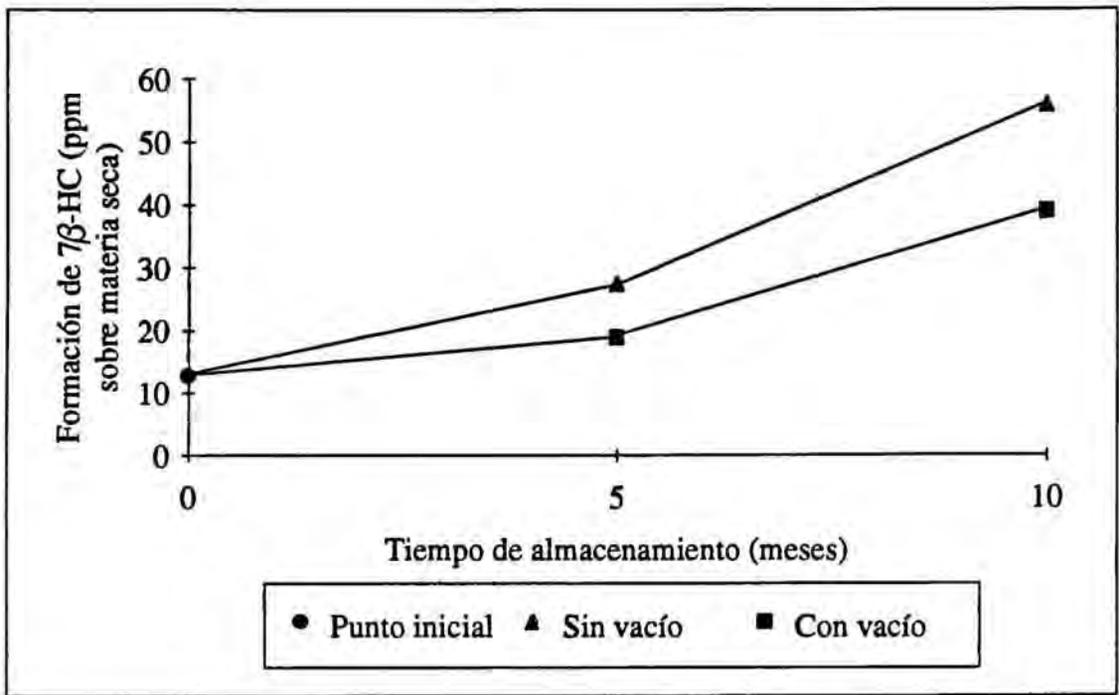


Figura 30-Evolución de la "formación de 7β-HC" a lo largo del estudio de almacenamiento en función de las condiciones de envasado.

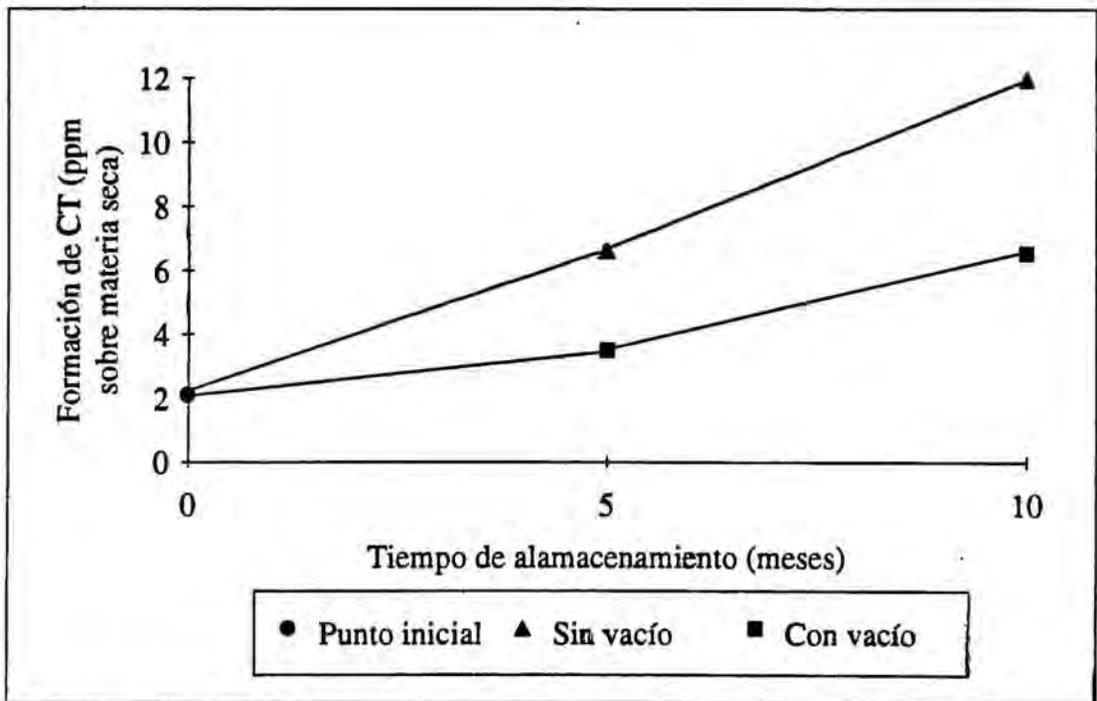


Figura 31-Evolución de la "formación de CT" a lo largo del estudio de almacenamiento en función de las condiciones de envasado.

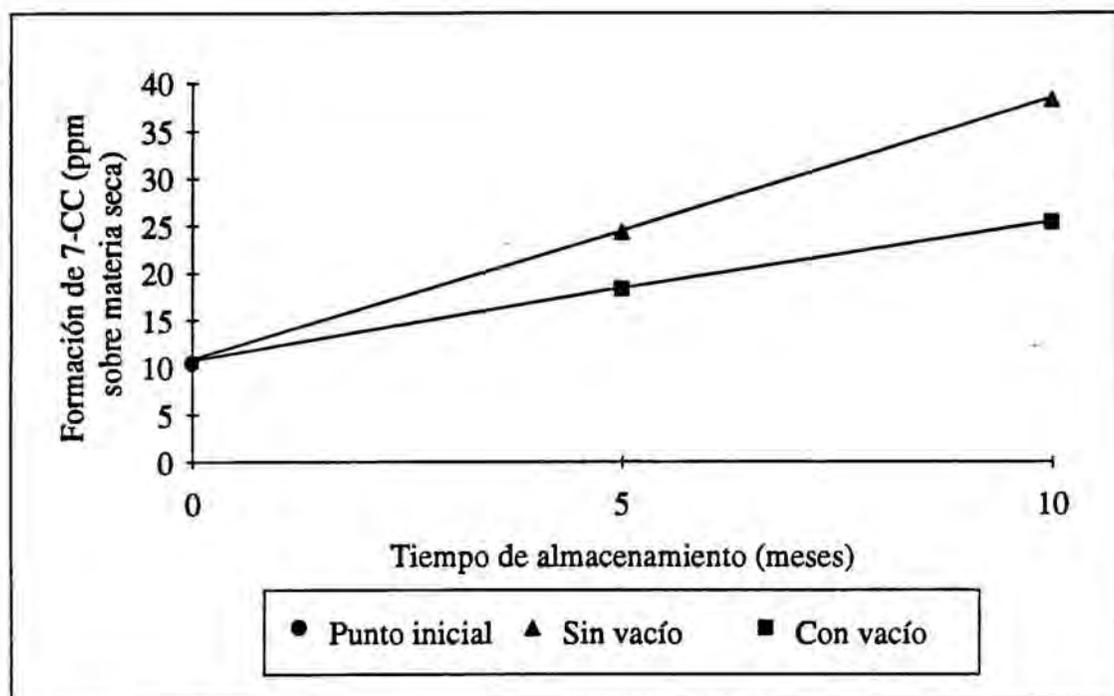


Figura 32-Evolución de la "formación de 7-CC" a lo largo del estudio de almacenamiento en función de las condiciones de envasado.

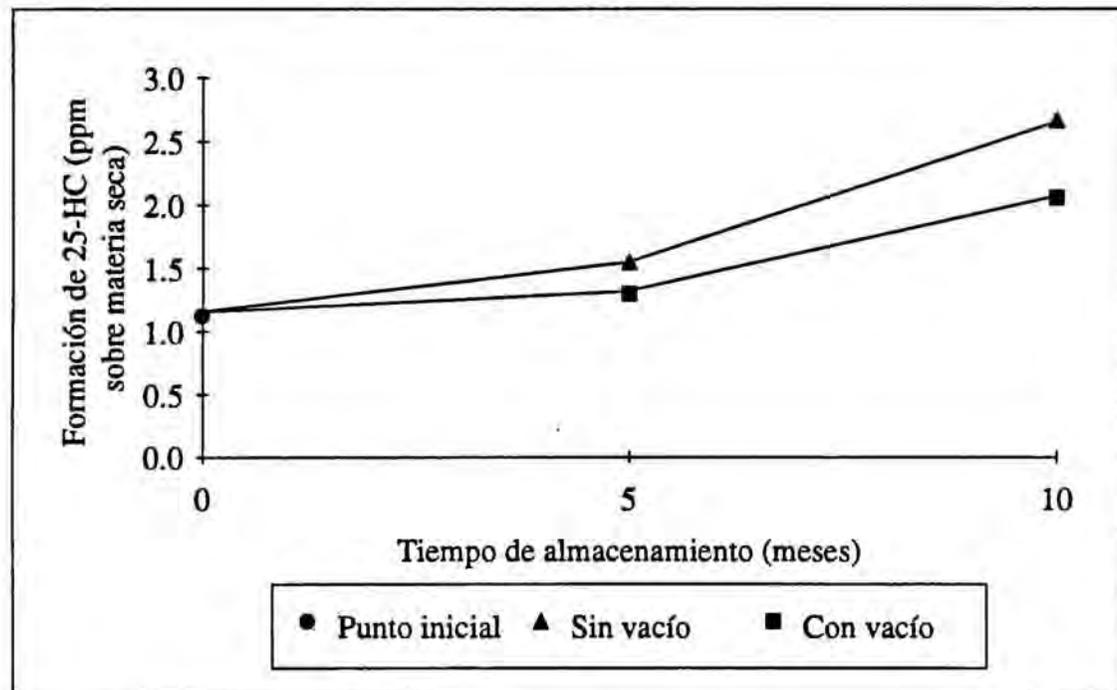


Figura 33-Evolución de la "formación de 25-HC" a lo largo del estudio de almacenamiento en función de las condiciones de envasado.

La pérdida de C20:4 n-6 y C22:6 n-3 depende muy significativamente de la temperatura de atomización y de las condiciones de almacenamiento (tabla 9). Además, en el caso del C20:4 n-6 también depende significativamente del tipo de antioxidante (tabla 9). Para estas dos respuestas no se ha podido estudiar como influye el tiempo de almacenamiento, pues, sólo se tenían los datos correspondientes a 10 meses de almacenamiento. Como se puede observar en la tabla 4 la pérdida de estos ácidos grasos es muy superior cuando el huevo ha sido producido a elevada temperatura de atomización (figura 34). Además, también se observa que el envasado de las muestras al vacío y en ausencia de luz evita, de forma notable, la pérdida de estos AGPI (figura 35). También en la tabla 4, se observa que los AGPI se pierden más fácilmente, cuando el antioxidante utilizado es la mezcla sinérgica PA + dl- α -T, y, además, en el caso del C20:4 n-6 esta diferencia en la pérdida es estadísticamente significativa (tabla 9). En la figura 36, se representa la pérdida de ambos AG en función del tipo de antioxidante utilizado, aunque en el caso del C22:6 n-3 la diferencia no es estadísticamente significativa. El comportamiento de estos AGPI es muy parecido, lo cual es lógico si tenemos en cuenta que la pérdida de estos dos AGPI presenta una relación lineal muy significativa ($r = 0.8927$, tabla 5).

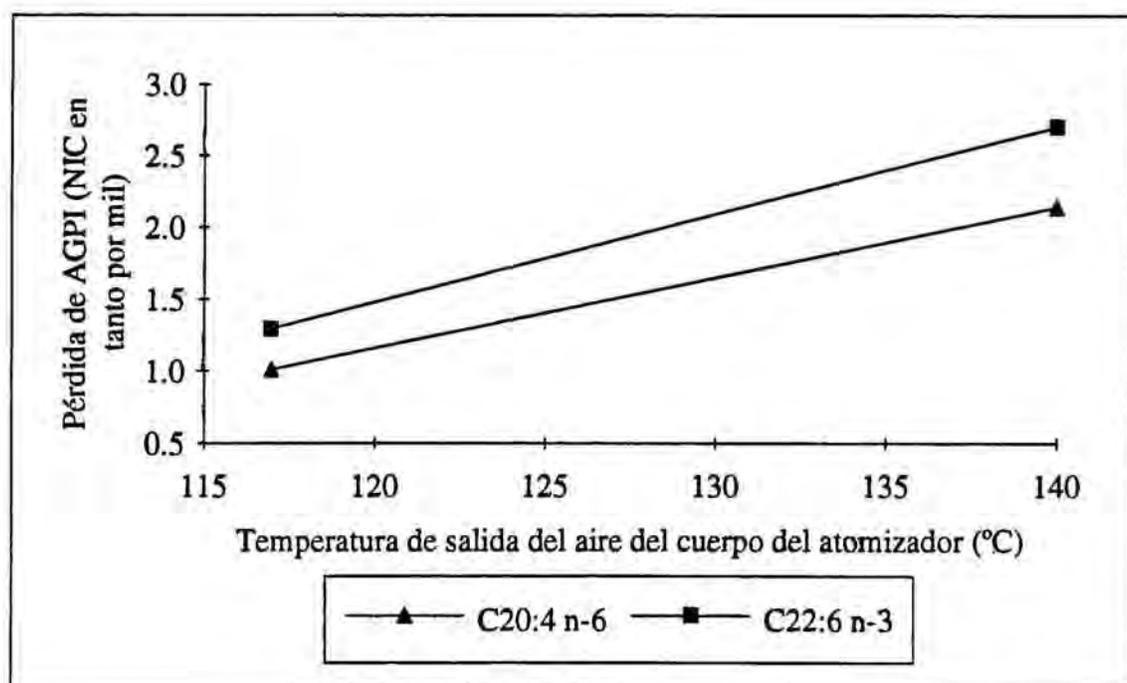


Figura 34-Pérdida de AGPI en función de la temperatura de atomización a la que se obtuvo el huevo en polvo (muestras almacenadas durante 10 meses).

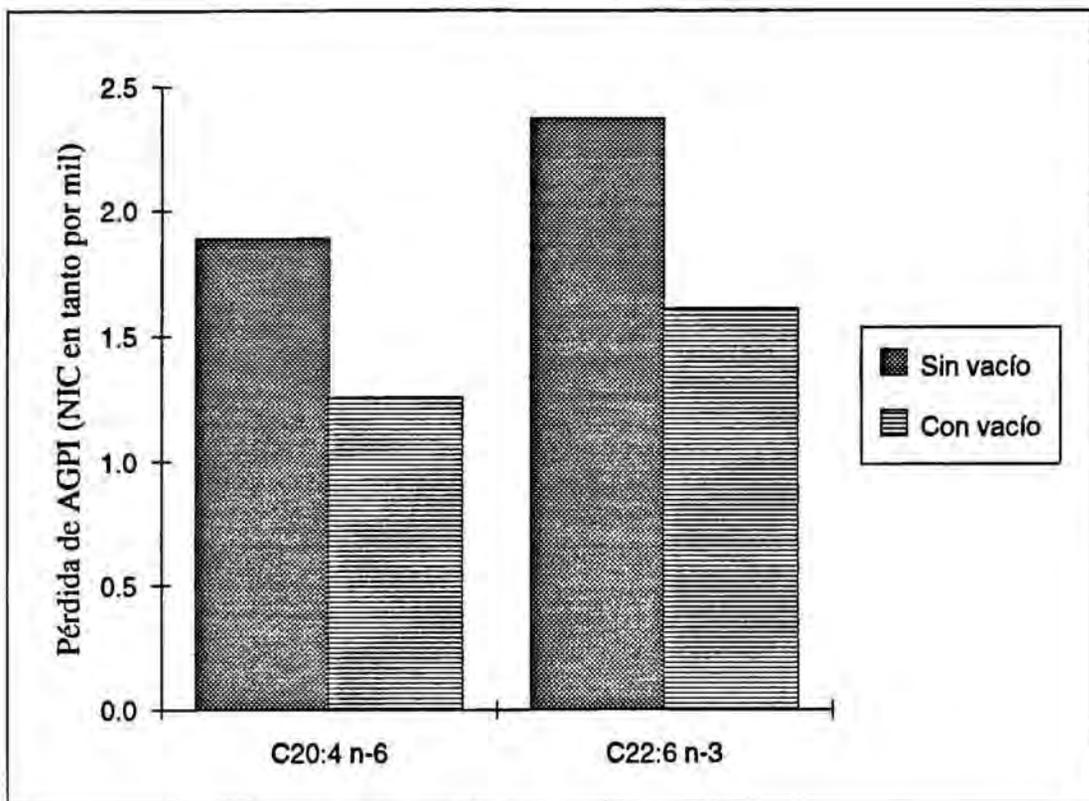


Figura 35-Pérdida de AGPI en función de las condiciones de almacenamiento (muestras almacenadas durante 10 meses).

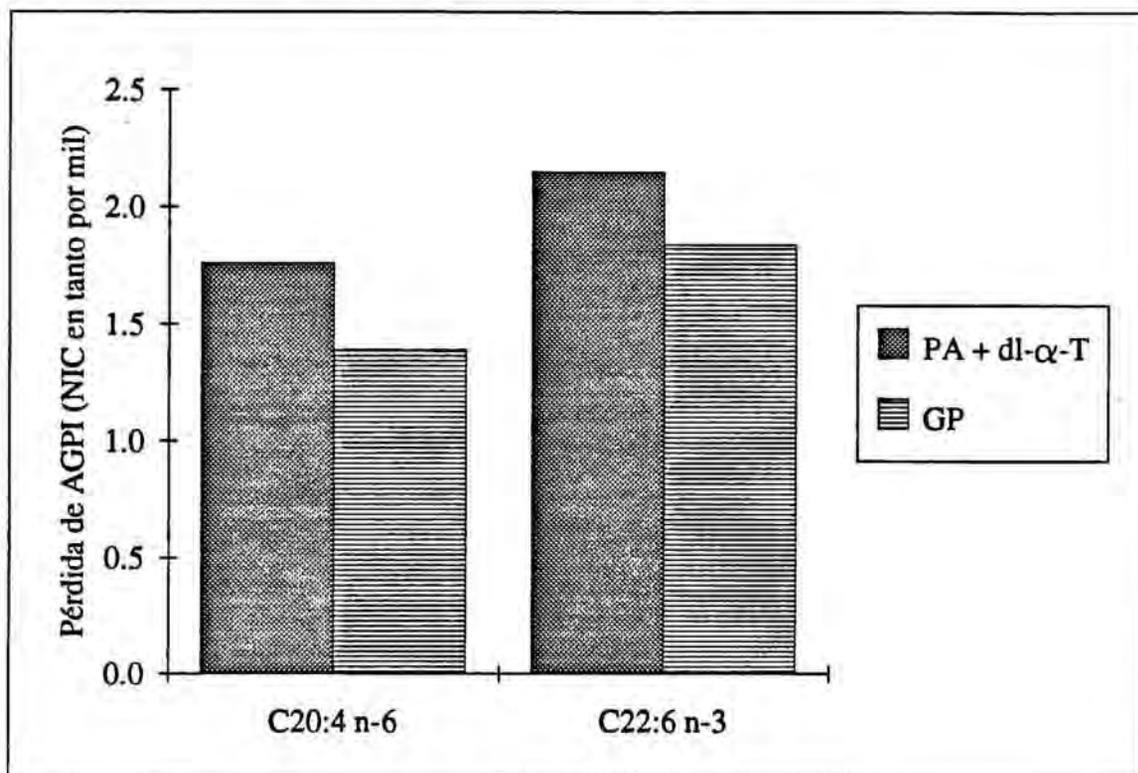


Figura 36-Pérdida de AGPI en función del tipo de antioxidante utilizado.

4.2.3. REGRESIÓN MÚLTIPLE.

Una vez visto que existen una serie de factores y de interacciones entre ellos que influyen significativamente sobre las diferentes respuestas estudiadas, interesa conocer la magnitud de esta influencia. Para ello, se aplicó la regresión múltiple que nos permitió estudiar la influencia de los diferentes factores cuantitativos (temperatura de atomización, concentración de antioxidante y tiempo de almacenamiento) sobre las respuestas.

En el diseño factorial además de estos tres factores cuantitativos se contemplaron otros dos factores cualitativos (tipo de antioxidante y condiciones de almacenamiento), lo cual nos obligó a calcular una ecuación de regresión para cada una de las combinaciones entre los niveles de estas dos variables cualitativas. Así, para cada respuesta se calcularon las cuatro ecuaciones de regresión correspondientes a las siguientes combinaciones:

- SV (sin vacío y ausencia de luz) y PA + dl- α -T (palmitato de ascorbilo + dl- α -tocoferol)
- SV (sin vacío y ausencia de luz) y GP (galato de propilo)
- CV (con vacío y presencia de luz) y PA + dl- α -T (palmitato de ascorbilo + dl- α -tocoferol)
- CV (con vacío y presencia de luz) y GP (galato de propilo)

Las ecuaciones de regresión se calcularon teniendo en cuenta sólo los factores e interacciones que influían significativamente sobre las respuestas ($P \leq 0.10$). El cálculo se realizó por el método de mínimos cuadrados, mediante el procedimiento "Stepwise variable selection" que selecciona los factores e interacciones que influyen sobre la respuesta con una probabilidad superior a la asignada (en nuestro caso $\geq 90\%$), de tal manera que los factores que influyen con una probabilidad $<$ a la asignada no son utilizados para el cálculo de las ecuaciones de regresión. La fórmula de cada una de las ecuaciones de regresión calculadas es:

$$Y = B_0 + \sum_{i=1}^{j=3} B_i X_i + \sum_{i=1}^{j=3} \sum_{j=1}^{j=3} B_{ij} X_i X_j$$

donde, Y es la respuesta en cuestión; B_0 , B_i y B_{ij} son los coeficientes de regresión; y X_i y X_j los factores.

En las tablas 10, 11, 12, 13 y 14, se presentan los coeficientes de regresión con su grado de significación, el coeficiente de determinación múltiple y la F del análisis de la variancia con su significación para las diferentes ecuaciones de regresión.

Estas ecuaciones de regresión nos permiten calcular el valor de la respuesta en función de los valores de los factores. Previamente al cálculo de las ecuaciones de regresión se realizó una transformación de las variables cuantitativas (factores) centrándolas y reduciéndolas, de tal manera que se pudieran estimar los efectos lineales y cuadráticos de forma independiente, es decir, obtener un diseño con variables ortogonalizadas. Este cambio de variables se realizó según el procedimiento descrito por Mata (1981), obteniéndose para cada factor los siguientes valores centrados y reducidos.

	Valor real	Valor centrado y reducido
Temperatura de atomización (X_1)	117 °C	-1
	140 °C	1
Concentración de antioxidante (X_2)	0 ppm	-1
	100 ppm	0
	200 ppm	1
Tiempo de almacenamiento (X_3)	0 meses	-1
	5 meses	0
	10 meses	1

Tabla 10-Coeficientes de regresión (B) con su grado de significación, coeficiente de determinación (r^2) y la F del análisis de la variancia para las ecuaciones de regresión calculadas con los datos procedentes de las muestras envasadas a presión atmosférica y con antioxidante PA + dl- α -T ($n = 36$).

Coefficientes	IPM ^a	IRM ^a	a _w ^a	Humedad	- K ₂₉₂ ^a	- K ₂₇₀ ^a	- K ₃₀₃ ^a	Pérdida de color	"Formación α -CE" ^a	"Formación 7 β -HC" ^a	"Formación CT" ^a	"Formación 7-CC" ^a	"Formación 25-HC" ^a
B ₀	0.0512***	0.1290***	0.3807***	4.6783***	7.3016***	1.5105***	0.9578***	15.9826***	11.1682***	29.5045***	7.3954***	25.5888***	1.6297***
B ₁	0.0039**	0.0234***	-	-0.1339**	0.4930***	0.2303***	0.1841***	1.5879***	3.7722***	6.8321***	1.6344***	6.1737***	0.1859**
B ₂	- ^b	0.0076***	0.0052*	0.0870 ^o	0.2196**	0.1426***	0.1552***	-	1.6329***	-	0.8708*	-	0.1500*
B ₃	-	0.0116***	0.1860***	2.0400***	0.7848***	0.0694*	-	3.8272***	10.7378***	22.7913***	5.2944***	15.1014***	0.8113***
B ₂₂	-0.0085**	-0.0116***	-	-	-	-0.1095*	-0.1068*	-	-	-	-	-	-
B ₃₃	0.0086**	0.0113***	-0.0675***	-0.6225***	-	-	-	-	4.6481***	6.9963**	-	-	0.3266**
B ₁₂	-	-0.0108***	-0.0046*	-0.1996***	-0.3504***	-0.1020***	-0.0911***	-	-2.1401***	-5.6286***	-	-	-0.1867**
B ₁₃	0.0035*	0.0031 ^o	0.0044*	-	0.1723**	-	-	0.8659**	2.2625***	4.3425***	0.731 ^o	3.3109*	-
B ₂₃	-	-	-	-	-	-	-	-	1.6925*	-	0.9088 ^o	-	-
r ²	0.5156	0.9423	0.9970	0.9868	0.9160	0.8423	0.8303	0.8729	0.9469	0.9426	0.8716	0.8424	0.8585
F	8.25***	65.34***	1810.13***	403.42***	65.42***	32.06***	37.93***	73.27***	71.27***	98.44***	40.74***	56.99***	36.40***

^a Símbolos: IPM, intensidad de pardeamiento producido por la reacción de Maillard medido como absorbancia a 420 nm; IRM, intensidad con la que se produce la reacción de Maillard medida como la relación entre las absorbancias a 335 nm y a 277 nm; a_w, actividad del agua; - K₂₉₂, incremento de la extinción específica a 232 nm; - K₂₇₀, incremento de la extinción específica a 270 nm; - K₃₀₃, incremento de la extinción específica a 303 nm; α -CE, 5,6 α -epoxi-5 α -colestan-3 β -ol; 7 β -HC, colest-5-en-3 β ,7 β -diol; CT, 5 α -colestan-3 β ,5,6 β -trioi; 7-CC, 3 β -hidroxicolest-5-en-7-oni; y 25-HC, colest-5-en-3 β ,25-diol.

^b El factor no influye significativamente sobre la respuesta.

^o Grado de significación ≤ 0.10

* Grado de significación ≤ 0.05

** Grado de significación ≤ 0.01

*** Grado de significación ≤ 0.001

Tabla 11-Coeficientes de regresión (B) con su grado de significación, coeficiente de determinación (r^2) y la F del análisis de la variancia para las ecuaciones de regresión calculadas con los datos procedentes de las muestras envasadas a presión atmosférica y con antioxidante GP ($n = 36$).

Coefficientes	IPM ^a	IRM ^a	a_w ^a	Humedad	$-K_{332}$ ^a	$-K_{270}$ ^a	$-K_{303}$ ^a	Pérdida de color	"Formación α -CE" ^{ns}	"Formación 7 β -HC" ^{ns}	"Formación CT" ^{ns}	"Formación 7-CC" ^{ns}	"Formación 25-HC" ^{ns}
B ₀	0.0406***	0.087***	0.3762***	4.6617***	7.2779***	1.4632***	0.8874***	15.9497***	8.6922***	25.3684***	5.6154***	23.0305***	1.4699***
B ₁	0.0025 ^o	0.0217***	-	-0.0954***	0.5372***	0.2672***	0.2193***	0.9859***	3.2551***	6.0868***	1.3429***	3.8383**	0.1855**
B ₂	- ^b	-0.0121***	-	0.0491 ^o	0.3005***	0.2164***	0.1969***	-	-	-2.8431*	-	-	-
B ₃	-	0.0081***	0.1844***	2.0797***	0.8911***	0.0727**	0.0497*	3.6697***	8.9157***	20.3027***	4.6355***	12.8119***	0.7380***
B ₂₂	-	0.0132***	-	-	-	-	-	-	2.0885 ^o	-	1.1601 ^o	-	-
B ₃₃	0.0121***	0.0075*	-0.0684***	-0.6622***	-	-	-	-	3.0956**	6.7623**	-	-	0.3572**
B ₁₂	-0.0038*	-0.0166***	-0.0048*	-0.2376***	-0.3172***	-0.0970***	-0.0989***	-0.7730*	-2.2678***	-5.6100***	-	-	-
B ₁₃	-	-	0.0077***	0.1022***	-	-	-	0.6100 ^o	2.5683***	4.2120**	1.1084**	3.4623*	0.1780**
B ₂₃	-	-	-	-	-	-	-	-	1.4204 ^o	-	-	-	-
r ²	0.4524	0.9391	0.9968	0.9960	0.8798	0.8950	0.9093	0.8280	0.9165	0.9252	0.8473	0.7860	0.8451
F	8.81***	74.53***	2242.25***	1115.33***	56.73***	66.05***	77.65***	37.30***	43.91***	59.77***	43.00**	39.18***	42.27***

^a Símbolos: IPM, intensidad de pardeamiento producido por la reacción de Maillard medido como absorbancia a 420 nm; IRM, intensidad con la que se produce la reacción de Maillard medida como la relación entre las absorbancias a 335 nm y a 277 nm; a_w , actividad del agua; $-K_{232}$, incremento de la extinción específica a 232 nm; $-K_{270}$, incremento de la extinción específica a 270 nm; $-K_{303}$, incremento de la extinción específica a 303 nm; α -CE, 5,6 α -epoxi-5 α -colestan-3 β -ol; 7 β -HC, colest-5-en-3 β ,7 β -diol; CT, 5 α -colestan-3 β ,5,6 β -triol; 7-CC, 3 β -hidroxicolest-5-en-7-ona; y 25-HC, colest-5-en-3 β ,25-diol.

^b El factor no influye significativamente sobre la respuesta.

^o Grado de significación ≤ 0.10

* Grado de significación ≤ 0.05

** Grado de significación ≤ 0.01

*** Grado de significación ≤ 0.001

Tabla 12-Coeficientes de regresión (B) con su grado de significación, coeficiente de determinación (r^2) y la F del análisis de la variancia para las ecuaciones de regresión calculadas con los datos procedentes de las muestras envasadas al vacío y con antioxidante PA + dl- α -T (n = 36).

Coefficientes	IPM ^a	IRM ^a	a _w ^a	Humedad	- K ₂₃₂ ^a	- K ₂₇₀ ^a	- K ₃₀₃	Pérdida de color	"Formación α -CE" ^{na}	"Formación 7 β -HC" ^{na}	"Formación CT" ^{na}	"Formación 7-CC" ^{na}	"Formación 25-HC" ^{na}
B ₀	0.0512***	0.1251***	0.1741***	2.5988***	6.9603***	1.5292***	0.9961***	14.3364***	9.0702***	19.7669***	3.6250***	18.0624***	1.3513***
B ₁	- ^b	0.0193***	-	-0.1035**	0.3567***	0.2128***	0.1835***	0.6600**	2.4974***	4.7403***	0.8015***	4.0501***	0.1587**
B ₂	-	0.0053**	0.0128**	0.2123***	0.1579**	0.1401***	0.1501***	-0.4858*	-	-	-	-	-
B ₃	0.0044**	0.0045**	0.0600***	0.6148***	0.2234***	-	-	2.0101***	4.3404***	13.4053***	2.3107***	7.4404***	0.5220***
B ₂₂	-0.0038 ^o	-0.0072*	-	-0.1419 ^o	-0.3416**	-0.1919***	-0.1773***	0.8500*	-	-	-	-	-
B ₃₃	0.0085***	0.0053 ^o	0.0145*	0.1894*	-	-	-	-0.9346*	-	7.3478***	0.8991**	-	0.3158**
B ₁₂	-0.0022 ^o	-0.0087***	-	-0.0877 ^o	-0.1043 ^o	-0.0538*	-0.0575**	0.5449***	-0.8889*	-1.9248*	-0.4037*	-	-
B ₁₃	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.3818*	-	-
B ₂₃	-	-	0.0119*	-	-0.1236 ^o	-	-	-	-	-	-	-	-
r ²	0.5177	0.9148	0.9176	0.9030	0.7819	0.8732	0.8783	0.7979	0.8515	0.9225	0.8992	0.7962	0.7341
F	8.32***	51.89***	77.91***	40.34***	17.33***	53.35***	55.95***	19.09***	61.16***	92.29***	53.50***	64.44***	29.45***

^a Símbolos: IPM, intensidad de pardamiento producido por la reacción de Maillard medido como absorbancia a 420 nm; IRM, intensidad con la que se produce la reacción de Maillard medida como la relación entre las absorbancias a 335 nm y a 277 nm; a_w, actividad del agua; - K₂₃₂, incremento de la extinción específica a 232 nm; - K₂₇₀, incremento de la extinción específica a 270 nm; - K₃₀₃, incremento de la extinción específica a 303 nm; α -CE, 5,6 α -epoxi-5 α -colestan-3 β -ol; 7 β -HC, colest-5-en-3 β ,7 β -diol; CT, 5 α -colestan-3 β ,5,6 β -triol; 7-CC, 3 β -hidroxicolest-5-en-7-ona; y 25-HC, colest-5-en-3 β ,25-diol.

^b El factor no influye significativamente sobre la respuesta.

^o Grado de significación \leq 0.10

* Grado de significación \leq 0.05

** Grado de significación \leq 0.01

*** Grado de significación \leq 0.001

Tabla 13-Coeficientes de regresión (B) con su grado de significación, coeficiente de determinación (r^2) y la F del análisis de la variancia para las ecuaciones de regresión calculadas con los datos procedentes de las muestras envasadas al vacío y con antioxidante GP ($n = 36$).

Coefficientes	IPM ^a	IRM ^a	a_w ^a	Humedad	$-K_{252}$ ^a	$-K_{270}$ ^a	$-K_{303}$ ^a	Pérdida de color	"Formación α -CE" ^a	"Formación 7 β -HC" ^a	"Formación CT" ^a	"Formación 7-CC" ^a	"Formación 25-HC" ^a
B ₀	0.0477***	0.0913***	0.1728***	2.4108***	6.9641***	1.4962***	0.8824***	14.7558***	7.9930***	18.1161***	3.3477***	17.9212***	1.2553***
B ₁	-	0.0170***	-	-	0.3848***	0.2561***	0.2290***	-	2.1500***	4.5472***	0.6573***	2.3755*	0.1393***
B ₂	-	-0.0137***	0.0077*	0.1825***	0.4100***	0.2487***	0.2140***	-0.9326***	-	-	-	-	-
B ₃	0.0029*	0.0068***	0.0605***	0.6358***	0.4846***	0.0552*	0.0465*	1.8430***	5.1673***	12.7937***	2.1759***	7.5320***	0.4072***
B ₂₂	-	0.0070**	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B ₁₃	0.0091***	0.0061**	0.0114 ⁰	0.2192**	-0.1605 ⁰	-0.0710 ⁰	-	-0.8374*	1.4387 ⁰	6.5058***	0.7815**	-	0.2410**
B ₁₂	-0.0037**	-0.0127***	-	-0.0742 ⁰	-0.0944 ⁰	-0.0678**	-0.0693***	-	-1.1927*	-2.2875**	-0.4515**	-	-
B ₁₃	-	-0.0037*	0.0091*	0.1225**	-0.1280*	-	-	-	-	2.1203**	0.3918*	-	0.1453**
B ₁₅	-	-	0.0099*	-	0.1238*	-	-	-	-	-	-	-	-0.0963 ⁰
r ²	0.5231	0.9328	0.9160	0.9211	0.9115	0.9256	0.9269	0.7327	0.8592	0.9367	0.9044	0.6336	0.8208
F	11.70***	55.51***	61.03***	65.36***	41.18***	74.61***	98.22***	29.24***	47.29***	88.83***	56.79***	28.53***	27.49***

^a Símbolos: IPM, intensidad de pardeamiento producido por la reacción de Maillard medido como absorbancia a 420 nm; IRM, intensidad con la que se produce la reacción de Maillard medida como la relación entre las absorbancias a 335 nm y a 277 nm; a_w , actividad del agua; $-K_{252}$, incremento de la extinción específica a 232 nm; $-K_{270}$, incremento de la extinción específica a 270 nm; $-K_{303}$, incremento de la extinción específica a 303 nm; α -CE, 5,6 α -epoxi-5 α -colestan-3 β -ol; 7 β -HC, colest-5-en-3 β ,7 β -diol; CT, 5 α -colestan-3 β ,5,6 β -triol; 7-CC, 3 β -hidroxicolest-5-en-7-ona; y 25-HC, colest-5-en-3 β ,25-diol.

^b El factor no influye significativamente sobre la respuesta.

⁰ Grado de significación ≤ 0.10

* Grado de significación ≤ 0.05

** Grado de significación ≤ 0.01

*** Grado de significación ≤ 0.001

Tabla 14-Coeficientes de regresión (B) con su grado de significación, coeficiente de determinación (r^2) y la F del análisis de la variancia para las diferentes ecuaciones de regresión correspondientes a la pérdida de C20:4 n-6 y C22:6 n-3 ($n = 12$).

Envasado a presión atmosférica y en presencia de luz					
		PA + dl- α -T		GP	
Coeficientes	Pérdida de C20:4 n-6	Pérdida de C22:6 n-3	Pérdida de C20:4 n-6	Pérdida de C22:6 n-3	
B ₀	2.1131***	2.6228***	1.6725***	2.1216***	
B ₁	0.8378**	0.8058*	0.5978**	0.8278**	
B ₂	— ^a	—	—	—	
B ₂₂	—	—	—	—	
B ₁₂	—	—	—	-0.4777 ^o	
r ²	0.5585	0.4975	0.5305	0.7247	
F	12.65**	9.90*	12.30**	11.85**	

Envasado al vacío y en ausencia de luz					
		PA + dl- α -T		GP	
Coeficientes	Pérdida de C20:4 n-6	Pérdida de C22:6 n-3	Pérdida de C20:4 n-6	Pérdida de C22:6 n-3	
B ₀	1.4079***	1.6725***	1.1057***	1.5511***	
B ₁	0.3907*	0.4857*	0.4330**	0.7033**	
B ₂	—	—	—	—	
B ₂₂	—	—	—	—	
B ₁₂	—	—	—	—	
r ²	0.4672	0.4851	0.5350	0.5736	
F	8.77**	9.42*	11.51**	13.45**	

* El factor no influye significativamente sobre la respuesta.

^o Grado de significación ≤ 0.10

* Grado de significación ≤ 0.05

** Grado de significación ≤ 0.01

*** Grado de significación ≤ 0.001

A través de los coeficientes de regresión presentes en las tablas 10, 11, 12, 13 y 14 se conocen los factores que influyen sobre cada respuesta y la magnitud con la que lo hacen. Como podemos observar, en las tablas 10, 11, 12 y 13, todos los ajustes presentan coeficientes de determinación elevados ($r^2 > 0.7$). La única respuesta que presenta ajustes, para las diversas condiciones, con r^2 bajos y F muy inferiores a las del resto de ajustes es IPM. La ecuación de regresión múltiple para la "formación de 7-CC" en vacío y con GP como antioxidante presenta una $r^2 = 0.6336$, pero la F es similar a la de otras respuestas. En relación con estas ecuaciones de regresión también es interesante señalar que la a_w y la humedad, para las muestras envasadas a P atmosférica, presentan ajustes con unas r^2 muy altas y F superiores a las del resto de ajustes. Esto es consecuencia de que en estas condiciones existe un factor que influye mucho más que los otros, que es el tiempo de

almacenamiento. Por ejemplo, si observamos la tabla 11 vemos que para la humedad, el efecto que presenta el tiempo de almacenamiento sobre esta respuesta es 22 y 42 veces superior al que presentan, respectivamente, la temperatura de atomización y la concentración de antioxidante. En la tabla 14 podemos observar que los diferentes ajustes para la pérdida de C20:4 n-6 y C22:6 n-3 presentan valores de r^2 y F inferiores a los de las ecuaciones de las restantes respuestas, lo cual es lógico si se tiene en cuenta que para los AGPI se trabaja con $n = 12$ y para el resto de respuestas con $n = 36$ y que para los AGPI se estudió un factor menos.

A modo de ejemplo, comentaremos uno de estos ajustes, interpretando el significado de los coeficientes de regresión. No obstante, previamente es necesario comentar unos aspectos generales de los coeficientes de regresión. B_0 es el término constante; B_1 , B_2 y B_3 son los términos lineales; B_{22} y B_{33} son los términos cuadráticos; y B_{12} , B_{13} y B_{23} son los términos de las interacciones de segundo orden entre factores. No se contempla el término cuadrático del factor X_1 , pues, con esta variable se trabaja tan solo a dos niveles. En caso de que para un factor el término lineal sea significativo y el cuadrático no lo sea implica que el aumento o disminución de la respuesta en función del factor es lineal (figura 37).

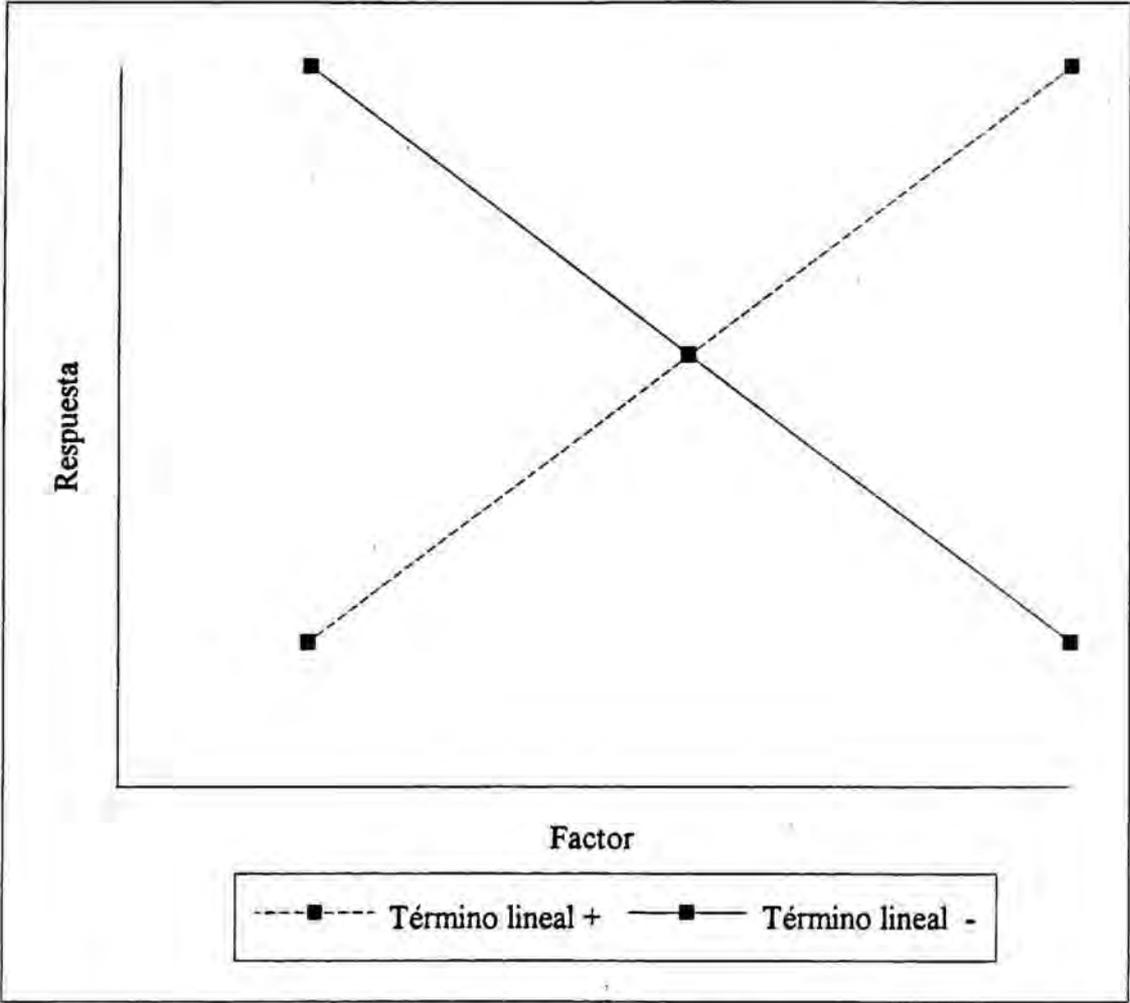


Figura 37-Evolución de una respuesta en función de un factor, cuando esta sólo depende del término lineal de este factor.

Cuando sólo es significativo el término cuadrático esto implica que los niveles extremos del factor presentan valores similares de la respuesta, al no ser el término lineal significativo, y que el nivel central se encuentra en un máximo, cuando el término cuadrático es negativo, o en un mínimo, cuando el término cuadrático es positivo (figura 38).

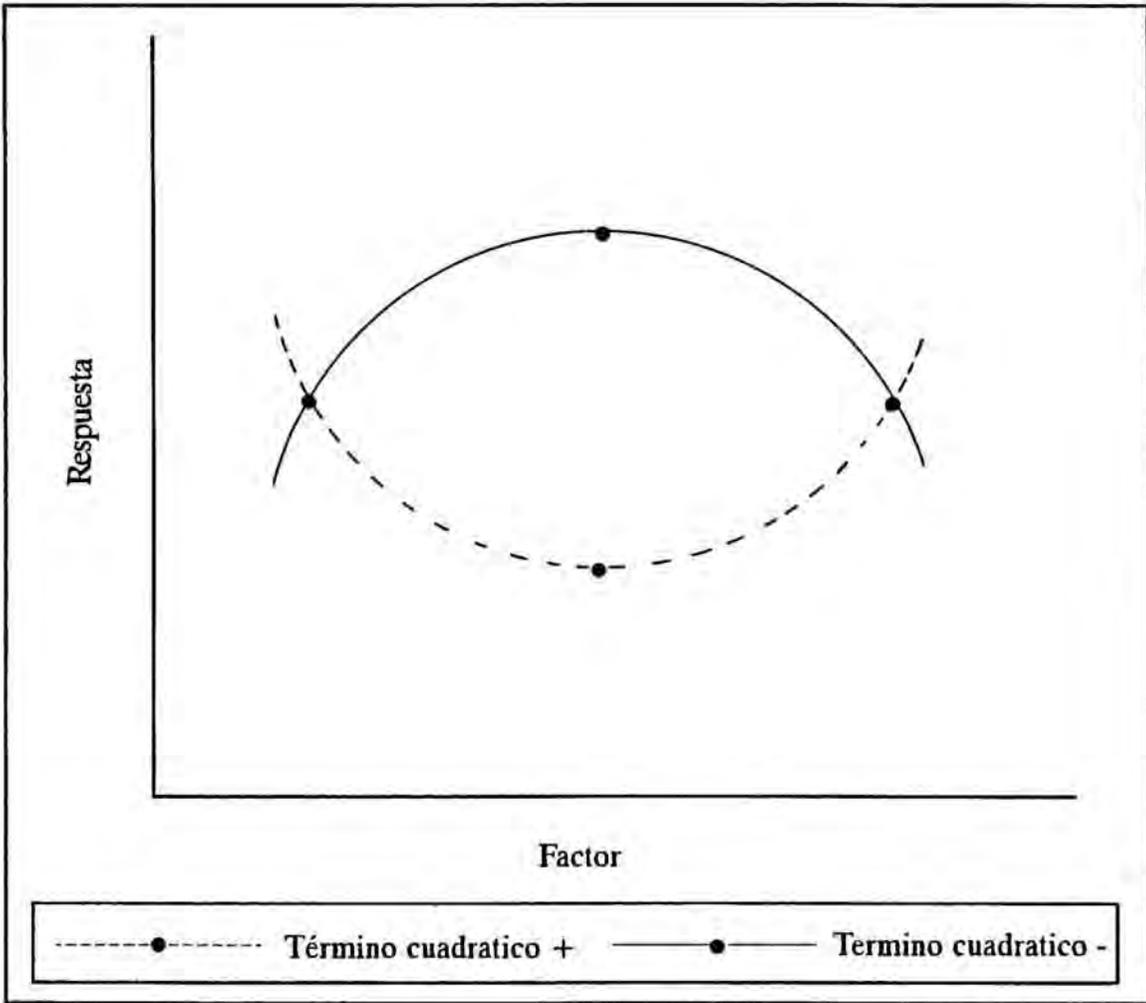


Figura 38-Evolución de una respuesta en función de un factor, cuando esta sólo depende del término cuadrático de este factor.

Quando son significativos tanto el término lineal como el cuadrático tenemos que los niveles extremos del factor presentan valores diferentes (término lineal significativo) y que el aumento o disminución de la respuesta en función del factor sigue una curva convexa o cóncava (término cuadrático significativo) (figura 39).

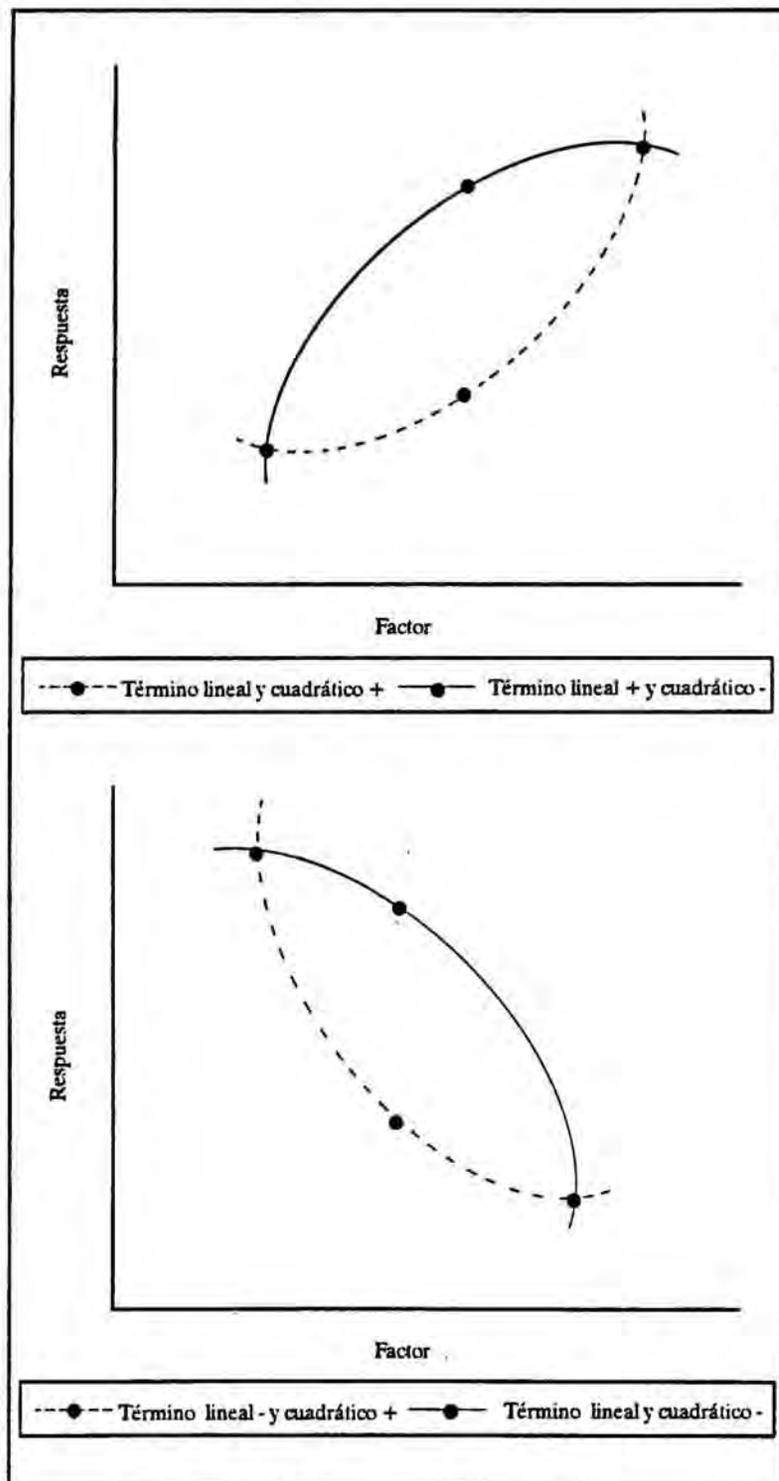


Figura 39-Evolución de una respuesta en función de un factor, cuando esta sólo depende de los términos lineal y cuadrático de este factor.

Cuando sólo es significativo el término correspondiente a la interacción entre dos factores la respuesta presenta un comportamiento diferenciado en función de uno de los factores, dependiendo de si nos encontramos a nivel bajo o alto del otro factor. Por ejemplo, llevando al extremo este caso, si el signo del término es positivo, a nivel bajo del factor 1, la respuesta decrece en función del factor 2 y, a nivel alto, sucede lo contrario; en cambio, si el signo del término es negativo, a nivel bajo del factor 1, la respuesta crece en función del factor 2 y, a nivel alto, ocurre lo contrario (figura 40). Sin llegar a los extremos de este ejemplo, podemos tener términos significativos correspondientes a interacciones que, por ejemplo, siendo positivos impliquen tan solo que, a nivel bajo del factor 1, la respuesta decrezca en función del factor 2 y, a nivel alto, también decrezca, pero menos acusadamente y, así, las diferentes combinaciones graduales que impliquen diferente comportamiento de la respuesta en función de un factor, dependiendo de al nivel en que nos encontremos del otro.

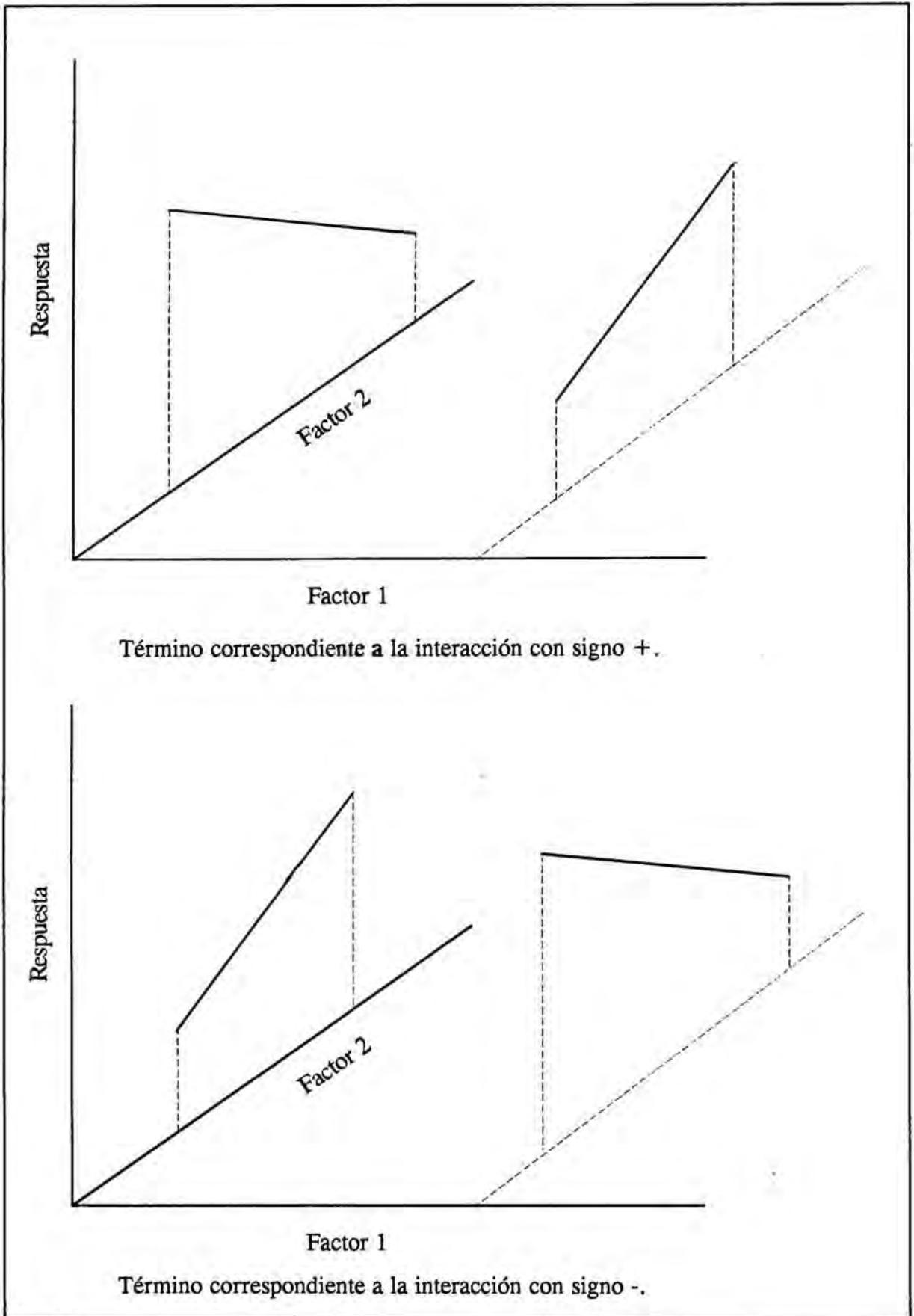


Figura 40-Evolución de la respuesta cuando esta sólo depende del término correspondiente a la interacción entre dos factores (caso llevado al extremo).

Como caso concreto para interpretar el significado de los coeficientes de regresión se ha escogido la ecuación de la humedad para el envasado a presión atmosférica y con GP como antioxidante (tabla 11). Esta ecuación presentó un término constante (B_0) muy significativo. Los términos lineales también lo fueron, pero B_2 con una probabilidad bastante baja. Según estos términos lineales vemos que el tiempo de almacenamiento influye sobre la humedad con una magnitud muy superior a la que lo hacen temperatura de atomización y concentración de antioxidante. Además, a partir de los signos de estos coeficientes, se deduce que al aumentar el tiempo de almacenamiento la humedad presenta valores más elevados y que al aumentar la temperatura de atomización se obtiene un producto más seco. La influencia de la concentración de antioxidante es prácticamente despreciable. Para el tiempo de almacenamiento no tan solo es significativo el término lineal, sino que también lo es el término cuadrático (B_{33}). Este término presenta un valor negativo bastante elevado, lo cual significa que el aumento de la humedad con el tiempo de almacenamiento no sigue una línea recta sino una curva convexa. También son significativos los términos correspondientes a las interacciones entre los factores X_1 y X_2 y X_1 y X_3 . El valor de B_{12} es -0.2376 , lo cual significa, en nuestro caso concreto, que a nivel bajo de la temperatura de atomización (X_1) la humedad será creciente en función de la concentración de antioxidante (X_2) y a nivel alto será decreciente. El valor de B_{13} es 0.1022 , lo cual significa, en nuestro caso concreto, que a nivel bajo de la temperatura de atomización la humedad crecerá menos en función del tiempo de almacenamiento que a nivel alto de esta temperatura.

La r^2 para esta respuesta es muy elevada (0.9960) y la F también (1115.33), lo cual significa que se trata de ajuste muy robusto y con ínfimas probabilidades de que sea debido al azar.

Una vez comentados los datos de la tabla 11, para la humedad representaremos y comentaremos las superficies de respuesta que derivan de su ecuación de regresión. Estas superficies representan la respuesta frente a dos factores, contemplando el efecto lineal y cuadrático de estos factores y la interacción entre ellos. En nuestro caso, en donde se trabaja con tres factores, para representar una superficie de respuesta lo que se hace es elegir los dos factores que influyen más claramente sobre la respuesta y representar la superficie a los diferentes niveles del factor que menos influye.

En consecuencia, si la ecuación de regresión para la humedad es la siguiente (tabla 11):

$$Y = 4.6617 - 0.0954 X_1 + 0.0491 X_2 + 2.0797 X_3 - 0.6622 X_3^2 - 0.2376 X_1X_2 + 0.1022 X_1X_3$$

Los dos factores que más influyen son X_1 y X_3 , con lo cual lo que haremos es representar las superficies de respuesta correspondientes a cada nivel de X_2 . Las ecuaciones de estas superficies son:

para $X_2 = -1$ (0 ppm),

$$Y = 4.6126 + 0.1422 X_1 + 2.0797 X_3 - 0.6622 X_3^2 + 0.1022 X_1X_3 \text{ ó}$$
$$Z = 4.6126 + 2.0797 X + 0.1422 Y - 0.6622 X^2 + 0.1022 XY;$$

para $X_2 = 0$ (100 ppm),

$$Y = 4.6617 - 0.0954 X_1 + 2.0797 X_3 - 0.6622 X_3^2 + 0.1022 X_1X_3 \text{ ó}$$
$$Z = 4.6617 + 2.0797 X - 0.0954 Y - 0.6622 X^2 + 0.1022 XY;$$

Para $X_2 = +1$ (200 ppm),

$$Y = 4.7108 - 0.3330 X_1 + 2.0797 X_3 - 0.6622 X_3^2 + 0.1022 X_1X_3 \text{ ó}$$
$$Z = 4.7108 + 2.0797 X - 0.3330 Y - 0.6622 X^2 + 0.1022 XY.$$

La representación de estas ecuaciones en forma de superficie de respuesta es la de las figuras 41, 42, 43, 44, 45 y 46. Como podemos observar de cada ecuación se realizan dos representaciones, una tridimensional y otra planar. Estos dos tipos de superficie de respuesta sólo difieren en que con la segunda es mucho más fácil obtener los valores de la respuesta a partir de los valores de los factores. Cuando se realizan estas representaciones, es interesante situar en el eje de las X el factor más influyente, pues, de esta manera, en la representación se observa más claramente la influencia de los factores. De estas seis representaciones, a modo de ejemplo, comentaremos las dos correspondientes al nivel medio de la concentración de antioxidante ($X_2 = 0$) (figuras 43 y 44). En la primera de estas

representaciones, vemos que la humedad disminuye ligeramente con la temperatura de atomización (término lineal significativo) y que aumenta considerablemente con el tiempo de almacenamiento siguiendo una superficie curvilínea convexa (término lineal y cuadrático significativo). También podemos apreciar, si somos buenos observadores, que existe un efecto debido a la interacción entre los factores X_1 y X_3 , pues, inicialmente la humedad del producto obtenido a baja temperatura de atomización es sensiblemente superior a la del producto obtenido a alta, mientras que a medida que pasa el tiempo de almacenamiento las humedades de estos productos se van igualando y cada vez se difumina más el efecto de la temperatura de atomización a la que se ha obtenido el huevo en polvo.

Esta interacción se observa mucho más claramente en la representación planar (figura 44). Esta representación consiste en una proyección de la superficie tridimensional sobre un plano, utilizando curvas de nivel, equidistantes en cuanto a valor de la respuesta. Así, por ejemplo, se observa que el tiempo de almacenamiento es el factor que más influye sobre la humedad y que la temperatura de atomización también influye sobre esta respuesta, pero más ligeramente. Se observa también que las curvas de nivel se encuentran más próximas al principio del período de almacenamiento, lo que significa que el aumento de la humedad a lo largo del almacenamiento no es uniforme y, por tanto, sigue una curva más pronunciada al principio que al final. Con esta representación se puede observar claramente la interacción entre temperatura de atomización y tiempo de envasado, pues, si observamos la primera curva de nivel (2.14%) y la última (5.66%), vemos que al principio del estudio de almacenamiento, cuando la humedad es de 2.14% para el huevo en polvo producido a alta temperatura de atomización, para el huevo en polvo producido a baja es de 2.51%; y, en cambio, al final del estudio de almacenamiento, cuando alcanza 5.66% para el huevo producido a alta temperatura, es de 5.71% para el producido a baja. Según esto vemos que a medida que transcurre el tiempo de almacenamiento las humedades del producto obtenido a baja y alta temperatura se van igualando. Con este tipo de representación es mucho más fácil calcular gráficamente el valor de la respuesta a partir del valor de los factores.

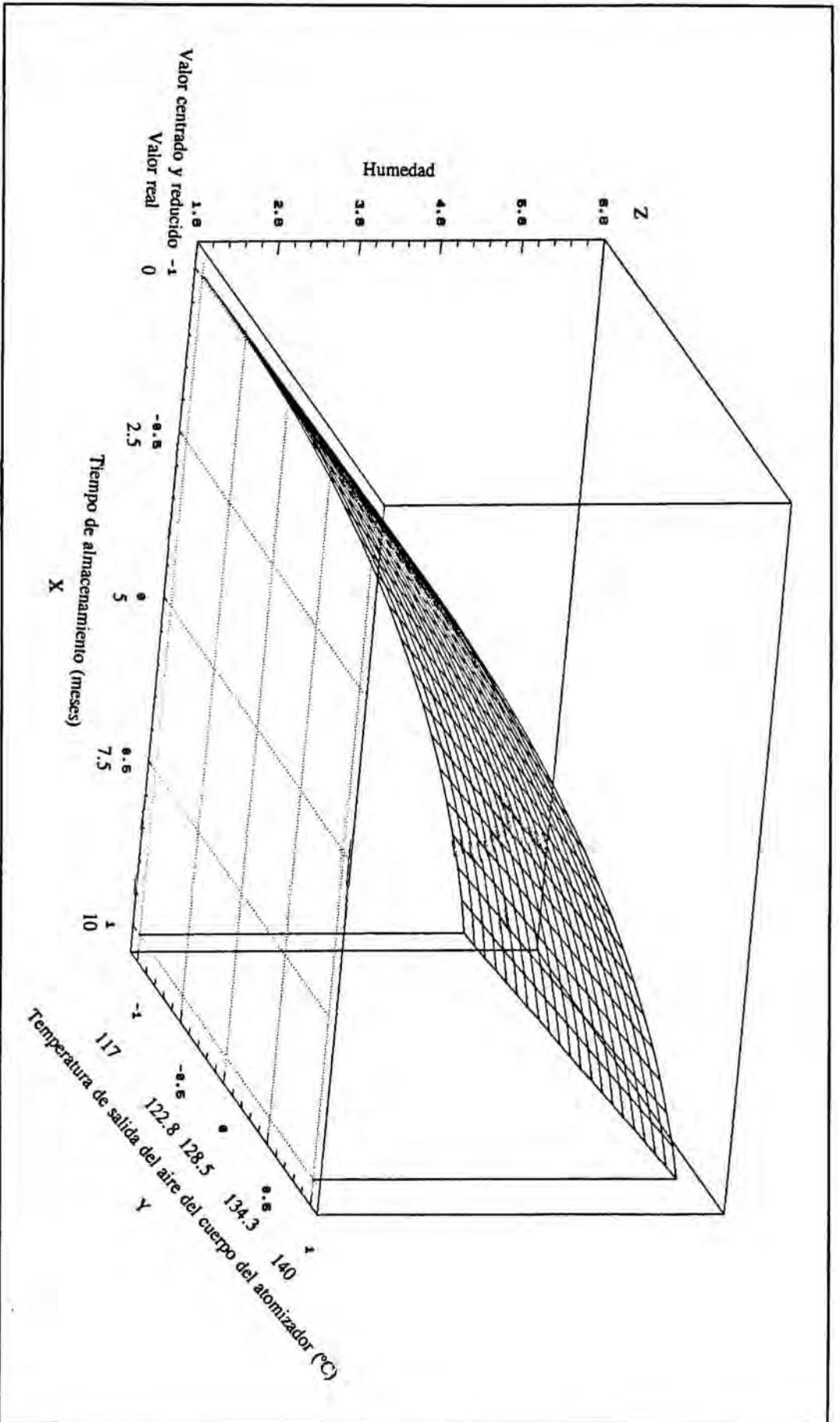
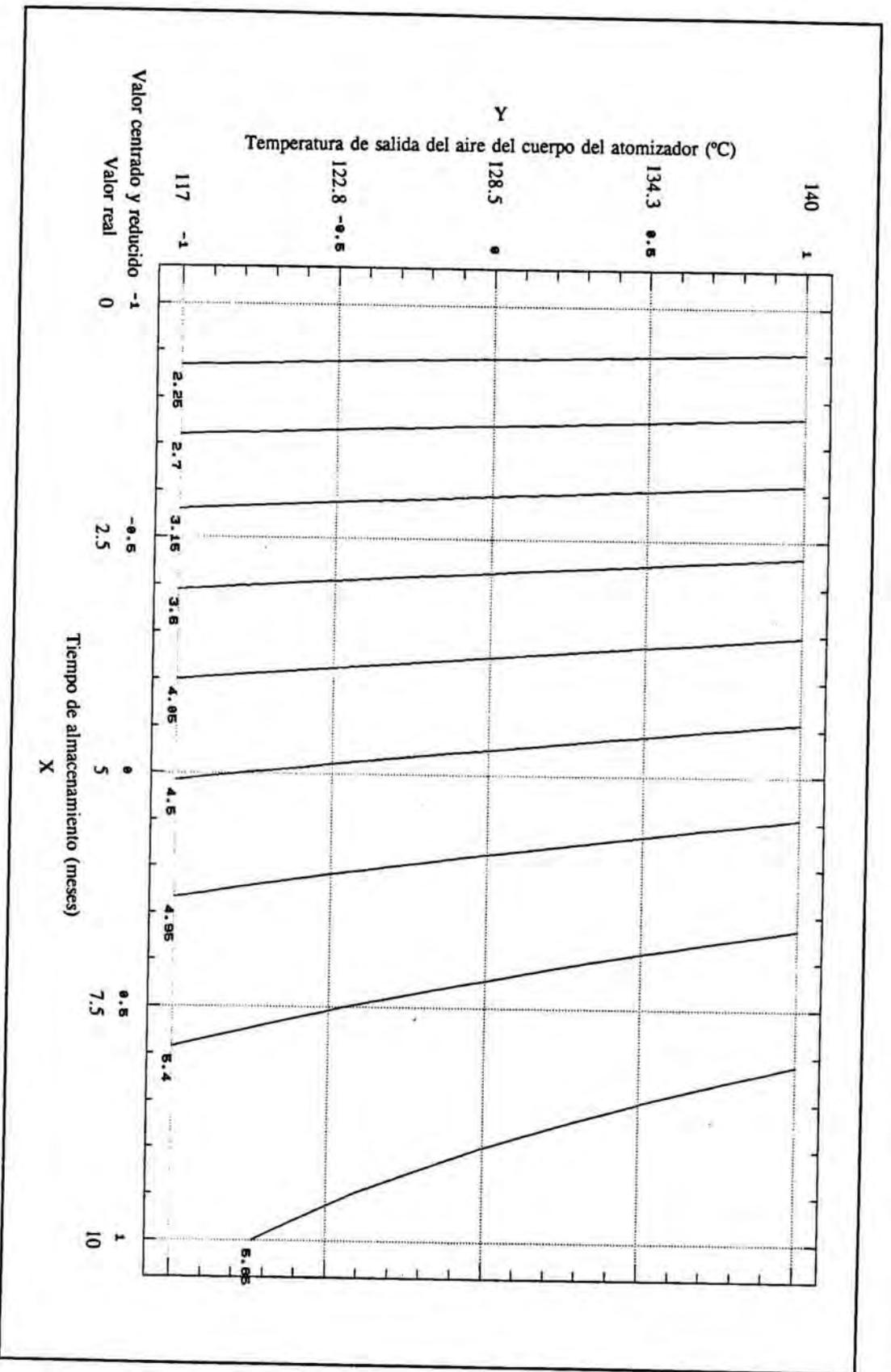


Figura 41-Superficie de respuesta que representa los valores de la humedad en función del tiempo de almacenamiento y la temperatura de atomización cuando las muestras se envasan a presión atmosférica y la concentración de GP es igual 0 ppm (representación tridimensional).



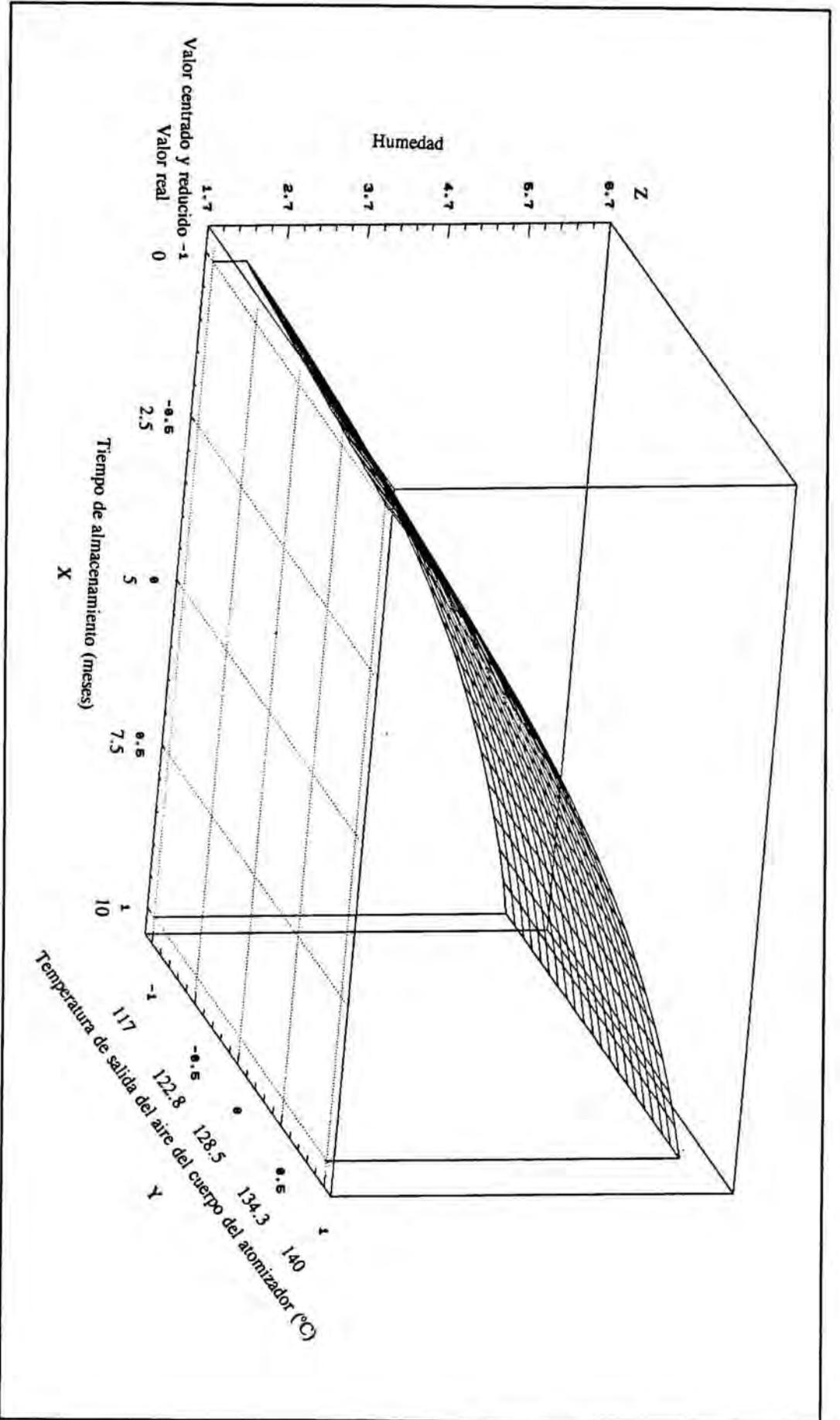


Figura 43-Superficie de respuesta que representa los valores de la humedad en función del tiempo de almacenamiento y la temperatura de atomización cuando las muestras se envasan a presión atmosférica y la concentración de GP es igual 100 ppm (representación tridimensional).

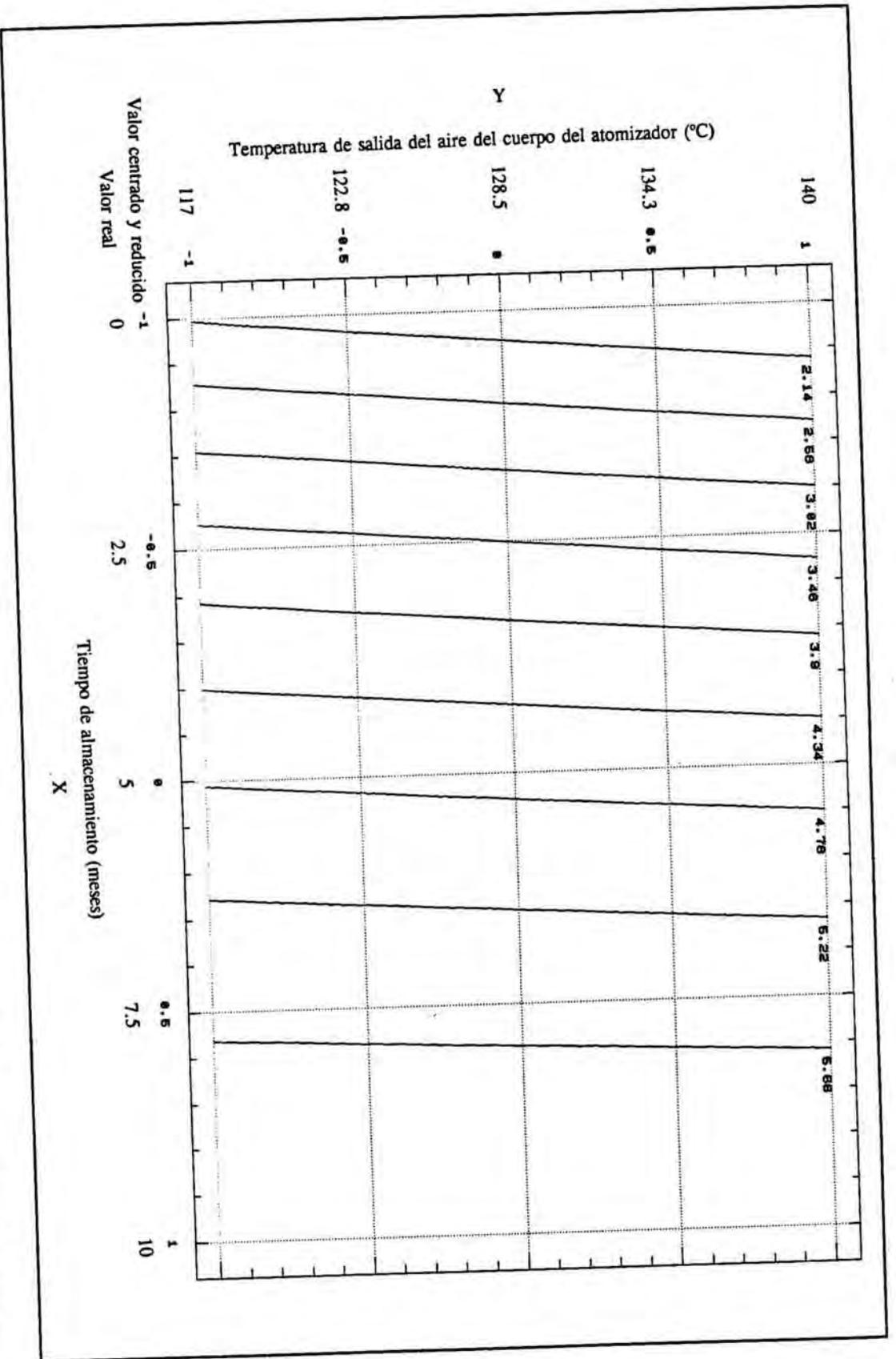


Figura 44-Superficie de respuesta que representa los valores de la humedad en función del tiempo de almacenamiento y la temperatura de atomización cuando las muestras se envasan a presión atmosférica y la concentración de GP es igual 100 ppm (representación planar).

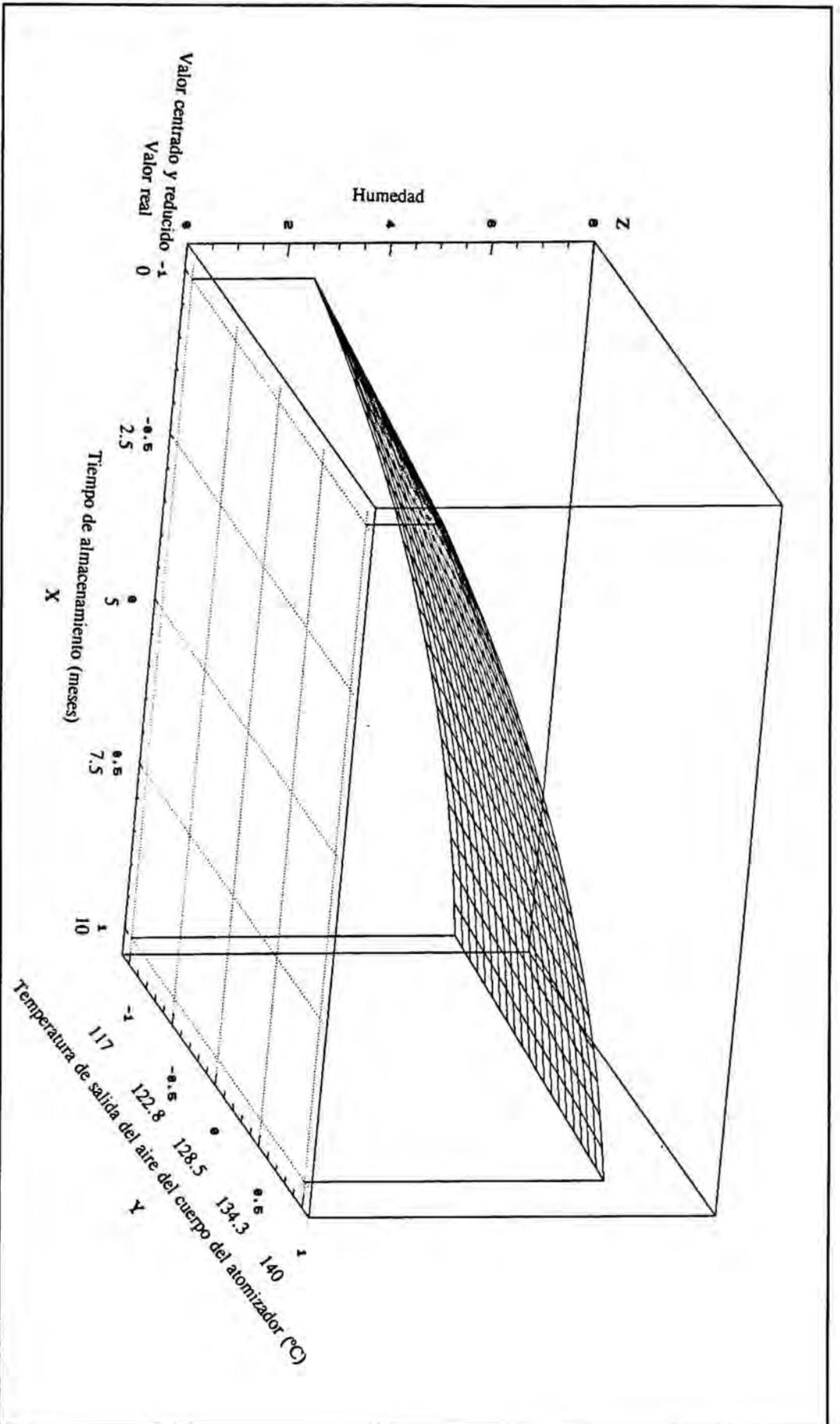


Figura 45-Superficie de respuesta que representa los valores de la humedad en función del tiempo de almacenamiento y la temperatura de atomización cuando las muestras se envasan a presión atmosférica y la concentración de GP es igual 200 ppm (representación tridimensional).

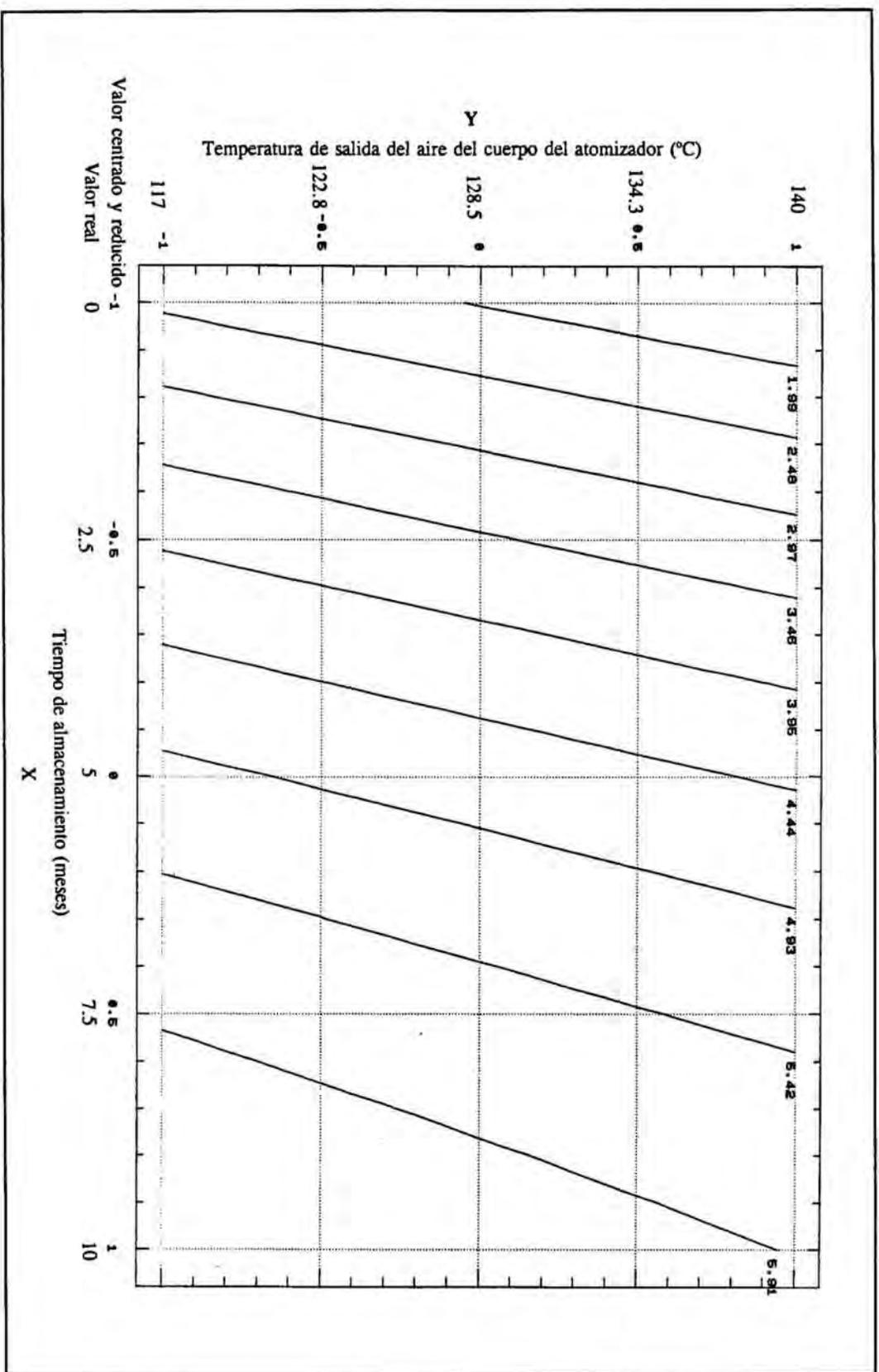


Figura 46-Superficie de respuesta que representa los valores de la humedad en función del tiempo de almacenamiento y la temperatura de atomización cuando las muestras se envasan a presión atmosférica y la concentración de GP es igual 200 ppm (representación planar).

5. CONCLUSIONES.

Se puede concluir que existe una relación lineal muy significativa entre la "formación de los diferentes OE" y las restantes respuestas estudiadas, a excepción de con la intensidad de pardeamiento producido por la reacción de Maillard (IPM), K_{270} y K_{303} . También cabe señalar que de los diferentes parámetros de oxidación estudiados el que se correlaciona mejor con la "formación de oxisteroles" es la pérdida de color. Otra conclusión interesante es que la K_{232} , que mide la oxidación primaria de los AGI, se correlaciona mucho mejor con la "formación de oxisteroles" que la K_{270} y la K_{303} , que miden la oxidación secundaria de estos compuestos. La "formación de los diferentes OE" se encuentra altamente correlacionada, lo cual indica que estos compuestos guardan un cierto paralelismo, en cuanto a su patrón de formación.

De la aplicación del ANOVA multifactorial y de la regresión múltiple sobre los resultados obtenidos surgieron las siguientes conclusiones. Como es lógico, la humedad y la actividad del agua del huevo en polvo crecen a lo largo del tiempo de almacenamiento y, además, este aumento es mucho mayor cuando el producto se envasa a presión atmosférica que cuando se envasa al vacío. La temperatura de atomización también influye sobre estas dos respuestas, obteniéndose a alta temperatura un producto más seco y con menor a_w .

La reacción de Maillard, que es uno de los parámetros de alteración que se han medido, presenta también una evolución a la alza con el tiempo de almacenamiento y, además, también aumenta con la temperatura de atomización.

Los restantes parámetros de alteración que se han medido hacen referencia a la oxidación de la fracción lipídica. Del análisis de los resultados obtenidos para estos parámetros se concluye que esta oxidación aumenta con la temperatura de atomización y con el tiempo de almacenamiento, pero es evitado por el envasado del producto al vacío y en ausencia de luz. Referente a estos parámetros de oxidación, además, es interesante resaltar ciertos aspectos más concretos. La pérdida de color, que es un parámetro de calidad utilizado a nivel industrial para el huevo en polvo, se ve evitada de forma estadísticamente significativa al aumentar la concentración de antioxidante. También referente a este parámetro, resulta

interesante señalar que la interacción tipo de antioxidante x temperatura de atomización también influye significativamente sobre él, resultando la mezcla sinérgica PA + dl- α -T evitar más eficazmente la pérdida de color a baja temperatura de atomización y el GP a alta temperatura. Otra interacción que influye sobre este parámetro es la existente entre tipo y concentración de antioxidante, de tal manera que la mezcla PA + dl- α -T es más efectiva a elevada concentración, mientras que el GP lo es a baja concentración. Otro de los parámetros de oxidación a comentar es la formación de oxisteroles, estos derivados siguen patrones de formación similares y su formación aumenta con la temperatura de atomización y a lo largo del tiempo de almacenamiento y, en cambio, se ve evitada por el envasado al vacío y en ausencia de luz. Además, el GP es más efectivo que la mezcla sinérgica PA + dl- α -T, evitando la formación de los diferentes oxisteroles. Sobre la formación de los diferentes oxisteroles también afectan las interacciones entre temperatura de atomización y tiempo de almacenamiento y entre las condiciones y tiempo de almacenamiento. De tal manera, que cuando el huevo es producido a baja temperatura de atomización o bien es envasado al vacío la formación de OE a lo largo del tiempo de almacenamiento es mucho menor.

Referente a la pérdida de AGPI, se puede concluir que aumenta con la temperatura de atomización y disminuye con el envasado al vacío y en ausencia de luz, no habiéndose estudiado su evolución a lo largo del período de almacenamiento, pues, como ya hemos comentado anteriormente, esta respuesta sólo se determinó en las muestras almacenadas durante 10 meses. Además, esta pérdida es evitada más eficazmente cuando el antioxidante utilizado es el GP.

6. BIBLIOGRAFÍA.

Bhagavan, H.N. y Nair, P.P. (1992). Antioxidants in dietary fats. En *Fatty acids in foods and their health implications* (C.K. Chow, Ed.). p.329-336. Marcel Dekker Inc., Nueva York-Basilea-Hong Kong.

BOE, 1976

Bourgeois, C.F. (1986). Utilisation du palmitate d'ascorbyle et de l'acide ascorbique comme antioxygènes dans les purées deshydratées. En **Los aditivos en la industria alimentaria** (procedente del simposio internacional sobre aditivos en la industria alimentaria, Madrid, 15-17 Octubre). p. 342-348. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid, España.

Cheftel, J.C., Cuq, J.L. y Lorient, D. (1989). *Proteínas alimentarias. Bioquímica. Propiedades funcionales. Valor nutritivo. Modificaciones químicas.* p.13. Acribia, S.A., Zaragoza, España.

Dall'Aglio, G. y Nicoli, M.C. (1992). Gli antiossidanti nell'industria alimentare. *Industria conserve* **67**, 50-59.

DOCE. (1992). Propuesta de la directiva del consejo sobre aditivos alimentarios distintos de los colorantes y edulcorantes (92/C 206/03). *DOCE N° C 206 del 13 de agosto de 1992*, 12-40.

Dziezak, J.D. (1986). Preservatives: antioxidants, the ultimate answer to oxidation, *Food Tech.* **Septiembre 1986**, 94-102.

Leatherhead Food Research Association. (1984). *Overseas food legislation.*

Maerker, G. y Unruh, J. (1986). Cholesterol oxides. 1. Isolation and determination of some cholesterol oxidation products. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **63**, 767-773.

Mata, J. (1981). *Curso de introducción a la planificación de experimentos y optimización empírica* (Escuela de Graduados Químicos, Barcelona). p. 23-25. Colegio Oficial de Químicos de Barcelona.

Morgan, J.N. y Armstrong, D.J. (1987). Formation of cholesterol-5,6-epoxides during Spray-drying of egg yolk. *J. Food Sci.* **52**, 1224-1227.

Nourooz-Zadeh, J. y Appelqvist, L-Å. (1987). Cholesterol oxides in swedish foods and food ingredients: Fresh eggs and dehydrated egg products. *J. Food Sci.* **52**, 57-62, 67.

Park, S.W. y Addis, P.B. (1986). Further investigation of oxidized cholesterol derivatives in heated fats. *J. Food Sci.* **51**, 1380-1381.

Rankin, S.A. y Pike, O.A. (1993). Cholesterol autoxidation inhibition varies among several natural antioxidants in a aqueous model system. *J. Food Sci.* **58**, 653-655, 687.

Tsai, L.S. y Hudson, C.A. (1985). Cholesterol oxides in commercial dry egg products: Quantitation. *J. Food Sci.* **50**, 229-231, 237.

V. CONCLUSIONES.

A) RESPECTO A LOS ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.

La revisión bibliográfica permite extraer las siguientes conclusiones.

- En relación con la formación de oxisteroles en alimentos los principales factores que influyen son: radiaciones, a_w , presencia de antioxidantes, tratamientos tecnológicos y tiempo y condiciones de almacenamiento. De estos factores los tratamientos tecnológicos que conllevan un tratamiento térmico (atomización, fritura, cocción, etc.) son los que inducen de forma más clara la formación de oxisteroles. Además, esta formación es más alta en alimentos con elevada densidad de colesterol, habiéndose detectado estos compuestos en algunos derivados lácteos, ovoproductos, productos cárnicos, alimentos sometidos a fritura y derivados de la pesca. No obstante, dada la novedad del tema, no se dispone de datos suficientes sobre los mecanismos de formación y contenidos de oxisteroles en muchos alimentos.

- En relación con los efectos biológicos de los oxisteroles se han descrito los siguientes: citotoxicidad, aterogénesis, mutagénesis y carcinogénesis, efectos sobre membrana, inhibición sobre la HMG-CoA reductasa y efectos sobre otras enzimas. De todos estos efectos los más profundamente estudiados son la citotoxicidad, la aterogénesis y la inhibición de la HMG-CoA reductasa, pero no por ello han dejado de ser objeto de controversia. Además, no se han establecido de forma clara los efectos que el consumo de alimentos que contienen oxisteroles puede provocar sobre los individuos, ni los niveles que pueden representar un riesgo apreciable para la salud.

- En relación con la metodología analítica para la determinación de oxisteroles, en la mayoría de protocolos se distinguen las siguientes etapas: extracción de la fracción lipídica; purificación de los oxisteroles; separación, identificación y cuantificación cromatográfica; y confirmación de la identificación por espectrometría de masas. El análisis de estos compuestos presenta los siguientes problemas: la gran similitud estructural de estos derivados oxidados, su presencia a nivel traza en la fracción lipídica, la facilidad con que se forman a partir del colesterol y la inestabilidad de alguno de ellos. Todos estos problemas hacen que el análisis de estos compuestos presente notables dificultades y que exista un número muy

elevado de metodologías para llevarlo a cabo. Esta situación lleva a cuestionar la validez de muchas de estas metodologías y a la necesidad de seguir trabajando en la mejora y validación de estos métodos analíticos.

B) RESPECTO A LA PARTE EXPERIMENTAL.

1) Respecto a la determinación de la composición en ácidos grasos y colesterol del huevo fresco.

- La composición en AG obtenida en nuestro trabajo representa una contribución al establecimiento de los niveles de una serie de AG poco estudiados en el huevo. Algunos de estos AG son PI y, aunque se encuentran en baja proporción en el huevo, influyen con especial relevancia sobre la estabilidad oxidativa de su fracción lipídica, así como sobre su valor nutricional. Las condiciones de determinación de los AG en forma de ésteres metílicos por CG fueron optimizadas y los resultados obtenidos en esta determinación se expresaron como normalización interna corregida. Para la corrección de la normalización se utilizaron los factores de respuesta relativos de los EMAG, que habían sido calculados previamente.

- Se ha podido establecer que el sistema de explotación es uno de los factores que influyen en la variabilidad de la composición en AG del huevo. Los huevos procedentes de grandes explotaciones presentan mayor contenido en AGPI que los huevos procedentes de pequeñas explotaciones, lo que confiere una mayor oxidabilidad a su fracción lipídica. Además, estos huevos presentan una relación n-6/n-3 mayor y, por tanto, serían menos equilibrados en su valor nutricional.

- También se ha comprobado la influencia de la dieta de las ponedoras en esta variabilidad. Un aumento en la proporción de pienso en la dieta provoca, entre otros, los siguientes cambios de composición: aumento de los AG *trans*-monoeno y aumento del C18:2 n-6, acompañado de una disminución en C18:1 n-9 y en AG n-3 PI de más de 20 átomos de carbono. Estos cambios afectan a la relación n-6/n-3 que resulta ser menos apropiada a medida que aumenta la proporción de pienso en la dieta. Según esto, la oxidabilidad de la fracción lipídica del huevo también aumenta con la proporción de pienso

- Los estudios de correlación entre los distintos AG determinados dieron lugar, de forma global, a las siguientes conclusiones: un aumento de C18:2 n-6 en el huevo va acompañado de una disminución en AGMI y AGPI n-3 de más de 20 átomos de carbono y de un aumento en C18:3 n-3 y AG *trans*-monoeno. La relación inversa existente entre C18:2 n-6 y los AGMI explica el hecho observado de que la relación de AGI/AGS en el huevo se mantiene constante, a pesar de que varíe la dieta de las ponedoras. La relación directa del C18:2 n-6 con el C18:3 n-3 e inversa con los AGPI de más de 20 átomos de carbono se relaciona con la capacidad de este ácido para inhibir la síntesis de AGPI n-3 de más de 20 átomos de carbono a partir del C 18:3 n-3. La relación lineal positiva existente entre los contenidos de C18:2 n-6 y los de AG *trans*-monoeno es seguramente debida a que los niveles de estos AG en el huevo dependen de un factor común que, en este caso, no es otro que la cantidad de pienso ingerida por las ponedoras.

- Se puso un método a punto que permitiera determinar de forma selectiva el contenido de colesterol en huevo. Se comprobó que el colesterol no era oxidado a lo largo del método analítico, que presentaba las siguientes etapas: extracción, saponificación en frío, silanización y determinación por cromatografía de gases.

- El contenido medio de colesterol hallado en muestras de huevo comercial fue de 392.34 mg por 100 g de fracción comestible, un valor bastante inferior a la mayoría de los publicados, pero concordante con algunos de los contenidos recientemente difundidos. Esta observación está en relación con el hecho constatado de que los métodos colorimétricos y enzimáticos, ampliamente utilizados, pero en recesión actualmente, presentan baja sensibilidad en comparación con los métodos cromatográficos.

2) Respecto a la metodología analítica para la determinación de oxisteroles.

- Se optimizaron las condiciones de tres métodos analíticos aplicables para la determinación de OE. De esta optimización caben destacar las siguientes etapas:

* Comprobación de que el colesterol no era oxidado a lo largo de los diferentes métodos analíticos ensayados.

* Observación de que los materiales constituyentes de los microtubos de silanización adsorbían los OE. Se comprobó que el vidrio presentaba menor adsorción que los materiales plásticos. Este hecho, como es lógico, afecta a los resultados y repercute claramente sobre los factores de respuesta de los analitos. Esta comprobación nos llevó a elegir el vidrio para el resto del trabajo.

* Se estudió la recuperación de los diferentes oxiesteroles a través de un cartucho de gel de sílice, utilizando 4 secuencias de elución que presentaban polaridad creciente. La secuencia más polar, constituida por: 5 ml de hexano, en donde se disuelven los patrones; 5 ml más de hexano; 10 ml hexano/éter etílico (95:5, v/v); 10 ml hexano/éter etílico (80:20, v/v); y 10 ml de acetona/metanol (60:20, v/v), resultó ser la que recuperaba los OE de forma más efectiva.

- Estos tres métodos analíticos una vez optimizados se compararon, concluyéndose que el método que presentaba una mayor fiabilidad para la determinación de OE era el que presentaba las siguientes etapas: extracción, saponificación en frío, purificación a través de un cartucho de gel de sílice, silanización y determinación cromatográfica.

3) Respecto al contenido de oxiesteroles en huevos y ovoproductos.

- El contenido de oxiesteroles en huevo fresco comercial, pasteurizado comercial y liofilizado producido en planta piloto es muy bajo, mientras que este contenido en los huevos en polvo comerciales es considerable y presenta una gran variabilidad, debida a que las condiciones de procesado y el período de almacenamiento no son los mismos para todas las muestras.

4) Respecto a la formación de oxiesteroles durante la obtención de huevo en polvo por atomización.

- Se ha observado que la obtención por atomización de huevo en polvo a partir de huevo fresco implica la formación de cantidades notables de OE, sobretodo de 7 β -HC y 7-CC.

- Se estudió la formación de OE a tres condiciones distintas de temperatura de atomización. Las temperaturas ensayadas fueron:

T_A) T° entrada del aire en el cuerpo del atomizador = 180 °C - T° salida = 120 °C;

T_B) T° entrada del aire en el cuerpo del atomizador = 193 °C - T° salida = 128 °C;

T_C) T° entrada del aire en el cuerpo del atomizador = 231 °C - T° salida = 142 °C.

Las diferencias en la formación de oxiesteroles obtenidas entre las condiciones T_A y T_B no fueron estadísticamente significativas, pero sí que lo fueron las diferencias entre T_A y T_C y las diferencias entre T_B y T_C, para el α -colesterolepóxido, el 7 β -hidroxicolesterol, el 25-hidroxicolesterol, así como para el total de oxiesteroles. Ello parece indicar la existencia de unas condiciones a partir de las cuales se dispara la formación de oxiesteroles.

- Se comprobó que la formación de oxiesteroles en huevo en polvo no se correlaciona con el contenido de colesterol en el huevo de partida.

5) Respecto a la formación de oxiesteroles y a la evolución de otros parámetros de alteración durante la producción de huevo en polvo por atomización y su posterior almacenamiento.

- La formación de los diferentes oxiesteroles sigue patrones similares y aumenta con la temperatura de atomización y a lo largo del tiempo de almacenamiento y, en cambio, se ve evitada por el envasado al vacío y en ausencia de luz. Además, el GP es más efectivo que la mezcla sinérgica PA + dl- α -T, evitando la formación de los diferentes oxiesteroles. Sobre esta formación también afectan las interacciones entre temperatura de atomización y tiempo de almacenamiento y entre las condiciones y tiempo de almacenamiento. De tal manera, que cuando el huevo es producido a baja temperatura de atomización o bien es envasado al vacío la formación de OE a lo largo del tiempo de almacenamiento es mucho menor.

- Del análisis de los resultados obtenidos para los demás parámetros de oxidación lipídica se concluye que esta oxidación aumenta con la temperatura de atomización y con el tiempo de

almacenamiento, pero se ve frenada por el envasado del producto al vacío y en ausencia de luz. Referente a estos parámetros de oxidación, además, es interesante resaltar ciertos aspectos más concretos. La pérdida de color, que es un parámetro de calidad utilizado a nivel industrial para el huevo en polvo, disminuye de forma estadísticamente significativa al aumentar la concentración de antioxidante. También referente a este parámetro, resulta interesante señalar que la interacción tipo de antioxidante x temperatura de atomización también influye significativamente sobre él, resultando la mezcla sinérgica PA + dl- α -T más eficaz para evitar la pérdida de color a baja temperatura de atomización y el galato de propilo a alta temperatura. Otra interacción que influye sobre este parámetro es la existente entre tipo y concentración de antioxidante, de tal manera que la mezcla PA + dl- α -T es más efectiva a elevada concentración, mientras que galato de propilo lo es a baja concentración.

- Referente a la pérdida de AGPI, se puede concluir que aumenta con la temperatura de atomización y disminuye con el envasado al vacío y en ausencia de luz, no habiéndose estudiado su evolución a lo largo del período de almacenamiento. Además, esta pérdida es evitada más eficazmente cuando el antioxidante utilizado es el GP.

- Como es lógico, la humedad y la actividad del agua del huevo en polvo crecen a lo largo del tiempo de almacenamiento y, además, este aumento es mucho mayor cuando el producto se envasa a presión atmosférica que cuando se envasa al vacío. La temperatura de atomización también influye sobre estas dos respuestas, obteniéndose a alta temperatura un producto más seco y con menor a_w .

- La reacción de Maillard aumenta con la temperatura de atomización y, además, presenta también una evolución a la alza con el tiempo de almacenamiento.

6) Respecto a la formación de oxiesteroles y sus correlaciones con otros parámetros de alteración del huevo en polvo.

- Se puede concluir que existen relaciones lineales muy significativas entre la formación de los diferentes OE en huevo en polvo y los restantes parámetros estudiados (intensidad con la que se produce la reacción de Maillard medida como la relación entre las absorbancias a

335 nm y a 277 nm, a_w , humedad, $-K_{232}$, pérdida de C20:4 n-6, pérdida de C22:6 n-3 y pérdida de color), a excepción de con la intensidad de pardeamiento producido por la reacción de Maillard medida como la absorbancia a 420 nm, $-K_{270}$ y $-K_{303}$, con las que se presentan relaciones lineales menos significativas. Así, cabe señalar que de los diferentes parámetros de oxidación estudiados el que se correlaciona mejor con la formación de oxiesteroles es la pérdida de color debida a la destrucción de carotenoides. Otra conclusión interesante es que la K_{232} , que mide la oxidación primaria de los AGI, se correlaciona mucho mejor con la formación de oxiesteroles que la K_{270} y la K_{303} , que miden la oxidación secundaria de estos compuestos. La formación de los diferentes OE se encuentra altamente correlacionada entre sí, lo cual indica que estos compuestos guardan un cierto paralelismo, en cuanto a su patrón de formación.

VI. APÉNDICES.

APÉNDICE 1-LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.

aa	Aminoácidos
ACE	Acetonitrilo
ADH	Ácido <i>cis</i> -4,7,10,13,16,19-DocosaHexaenoico
AEP	Ácido <i>cis</i> -5,8,11,14,17-EicosaPentaenoico
AG	Ácido(s) Graso(s)
AGI	Ácido(s) Graso(s) Insaturado(s)
AGL	Ácido(s) Graso(s) Libre(s)
AGMI	Ácido(s) Graso(s) Monoinsaturado(s)
AGPI	Ácido(s) Graso(s) Polinsaturado(s)
AGS	Ácido(s) Graso(s) Saturado(s)
AI	Amplitud de intervalo
AP	Anchura de pico a media altura
ATB	Ácido 2-tiobarbitúrico
a_w	Actividad de agua
BUT	Butanol
BPF	Buenas Prácticas de Fabricación
CB	Cloruro de Benzoilo
CC	Columna Capilar
CCF	Cromatografía en Capa Fina
CCFAE	Cromatografía en Capa Fina Alta Eficacia
7-CC	7-CetoColesterol
22-CC	22-CetoColesterol
6-CCL	6-CetoCoLestanol
7-CCL	7-CetoCoLestanol
22-CCL	22-CetoCoLestanol
CE	Colesterol-5,6-Epóxido
CEs	Colesterol-5,6-Epóxidos
α -CE	Colesterol-5 α ,6 α -Epóxido
β -CE	Colesterol-5 β ,6 β -Epóxido
CG	Cromatografía de Gases
CG-EM	Cromatografía de gases-Espectroscopía de Masas
5 α -CL	5 α -CoLestano
CLAE	Cromatografía Líquida de Alta Eficacia
CLO	Cloroformo
CoC	CoCromatografía
C-7 OE	Oxiesteroles con una función oxigenada sobre el carbono n ^o 7
CR	Columna de Relleno
CRT	Carotenoide(s)
CS	Casi Significativo(a)
CT	ColestanTriol
CV	Coefficiente de Variación
CV	Con vacío y ausencia de luz
DIL	Detector de Ionización de Llama
dl- α -T	dl- α -tocoferol
E	Estigmasterol
EMAG	Éster(es) Metílico(s) de lo(s) Ácido(s) Graso(s)
EM	Éster(es) metílico(s) ó Espectrometría de Masas ó Espectro de Masas
FL	FosfoLípidos

FM	Fase Móvil
FRR	Factor(es) de Respuesta relativo(s)
FRRE	Factor(es) de Respuesta relativo(s) Empírico(s)
FRRT	Factor(es) de Respuesta relativo(s) teórico(s)
GP	Galato de Propilo
GT	Grasa Total
4 β -HC	4 β -HidroxiColesterol
7-HC	7-HidroxiColesterol
7-HCs	7-HidroxiColesterolos
7 α -HC	7 α -HidroxiColesterol
7 β -HC	7 β -HidroxiColesterol
19-HC	19-HidroxiColesterol
20-HC	20-HidroxiColesterol
20 α -HC	20 α -HidroxiColesterol
20S-HC	(20S)-20-HidroxiColesterol
22S-HC	(22S)-22-HidroxiColesterol
23R-HC	(23R)-23-HidroxiColesterol
24R-HC	(24R)-24-HidroxiColesterol
24S-HC	(24S)-24-HidroxiColesterol
25-HC	25-HidroxiColesterol
(25R)-26-HC	(25R)-26-HidroxiColesterol
(25S)-26-HC	(25S)-26-HidroxiColesterol
26R-HC	(26R)-26-HidroxiColesterol
26S-HC	(26S)-26-HidroxiColesterol
HEX	Hexano
5 α -HPC	5 α -HidroPeroxioColesterol
7 α -HPC	7 α -HidroPeroxioColesterol
7 β -HPC	7 β -HidroPeroxioColesterol
7 α -HS	7 α -HidroxiSitosterol
7 β -HS	7 β -HidroxiSitosterol
IC	Intervalo de Confianza
IP	Índice de Peróxidos
IPM	Intensidad de Pardeamiento debido a la reacción de Maillard medida como absorbancia a 420 nm
IR	Espectroscopía Infrarroja
IRM	Intensidad con la que se produce la Reacción de Maillard medida como la relación de absorbancias (A_{335}/A_{277}).
ISO	Isopropanol
LD	Límite de Detección
LC	Límite de Cuantificación
MET	Metanol
MI	Monoinsaturado(s)
Nº Át de C	Número Átomos de Carbono
ND	No Detectado
NIC	Normalización Interna Corregida
NS	No Significativo(a)
OE	OxiEsterol(es)
P	Grado Significación

PA	Palmitato de Ascorbilo
PC	Pérdida de color
PI	Polinsaturado(s) ó Patrón Interno
PP	Polipropileno
PTV	Programmed Temperature Vaporizing
RMN	Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear
S	β -Sitosterol
α -SE	Sitosterol-5 α ,6 α -Epóxido
β -SE	Sitosterol-5 β ,6 β -Epóxido
SV	Sin Vacío y presencia de luz
TEAP	TriEtilAminohidroxiPropil
TMS	Derivatización en forma de TriMetilSilil éteres
TG	TriGlicéridos
TR	Tiempo de Retención
UV	Espectroscopia UltraVioleta
*	Marca inicio programa de temperatura de horno