

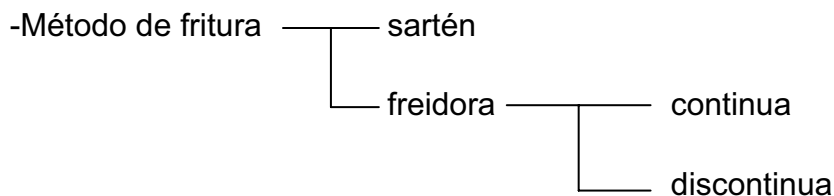
II. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

II.1. PROCESO DE LA FRITURA

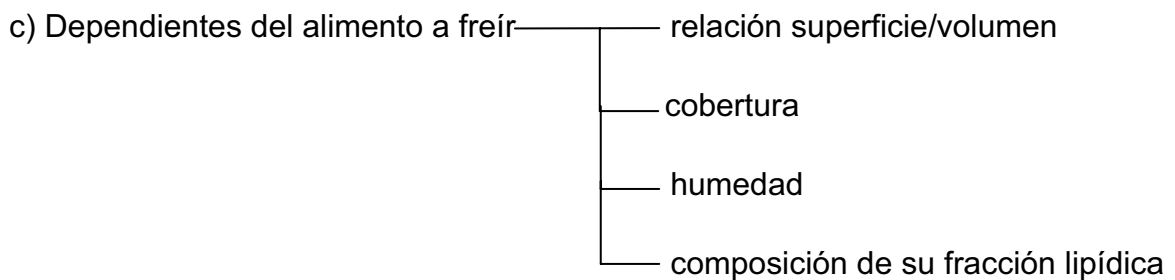
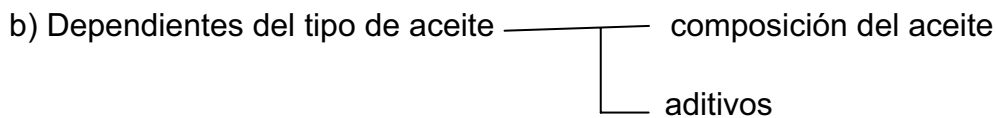
La fritura es el proceso culinario o industrial que implica la utilización como medio de un aceite o grasa calentado a elevada temperatura, en el interior del cual se introduce el alimento para su preparación o cocción. Numerosas variables conducen el avance del proceso y llevan a la optimización de las condiciones de fritura para cada tipo de producto (Brinkmann, 2000; Varela, 1988). Las principales variables a considerar son:

a) Dependientes del proceso

-Temperatura/Tiempo



-Material del recipiente



El conjunto de estas variables determina que las características del producto frito puedan resultar diferentes, así como que la alteración del medio de fritura también sea variable.

El proceso de fritura es un método culinario que requiere un tiempo pequeño de preparación y confiere al alimento un aroma y textura más sabrosos favoreciendo la digestión de ciertos nutrientes. Por todo ello, el alimento es más aceptable para el consumidor. Como proceso térmico, destruye bacterias, toxinas y ciertos

enzimas, además de disminuir la humedad relativa del alimento (Pokorny, 1999; Varela, 1994).

El aceite o grasa usada en la fritura determina la aceptabilidad del alimento, ya que en parte, el aceite de fritura es absorbido por éste. En el aceite de fritura se producen una gran cantidad de cambios físicos y químicos, como consecuencia de la interacción entre el aceite, el agua y otros componentes del alimento. Por todo ello, el aceite utilizado determina la calidad del alimento, así como las condiciones del proceso y la composición del producto (Vitrac y col., 2000; Orthofer y Cooper, 1996a).

En la Tabla 1, se recogen algunos de los aceites más utilizados para la fritura industrial o de restauración.

Tabla 1. Principales tipos de grasas y aceites utilizados para la fritura.

Tipo	Grasas y aceites
Grasas animales	Manteca cerdo
Aceites vegetales	Sebos
	Oliva
	Girasol
	Soja
	Maíz
	Algodón
	Colza
Grasas vegetales	Cacahuete
	Palma
	Palmiste
Fracciones de grasas	Coco
	Estearina de algodón
	Oleína de palma
Grasas Hidrogenadas	Estearina de palma
	Aceite de pescado hidrogenado
	Oleína de palma hidrogenada
	Aceite de soja hidrogenado

II.2. SISTEMAS DE FRITURA

II.2.1. Fritura continua

Se trata de un proceso de fritura con una producción altamente automatizada, que permite trabajar con incorporación continua de materia prima a freír y de aceite, para mantener constantes las condiciones del proceso. Dentro de este grupo se encuentra la fritura industrial aplicada a las patatas y a ciertos productos de

aperitivo (*snacks*). Este tipo de fritura origina grandes volúmenes de producto, que se generan en un equipo moderno en un corto periodo de tiempo. De esta forma, el margen de error es pequeño, por lo que se deben establecer criterios idóneos para la calidad de los aceites que se compran, los cuales deben controlarse para cada lote de entrega antes de aceptarlos para ser usados en la fritura. Por otra parte, la industria que fríe patatas o *snacks* debe abordar los problemas de desarrollo de flavor adverso durante el almacenamiento. Esta situación se puede originar debido a precursores de oxidación posiblemente generados en el aceite como resultado del proceso de fritura.

Para evitar la aparición de un flavor desagradable se realizan controles de calidad del aceite y del producto frito, controlándose los diferentes puntos críticos del proceso de fritura (Rossell, 1998).

Propiedades y composición del aceite.

En general, la selección del aceite y grasa de fritura está muy determinada por su precio y disponibilidad, así como por sus características tecnológicas.

Una amplia variedad de aceites y grasas refinadas son utilizados como medio de fritura (Tablas 1 y 2), donde los aceites mayoritariamente monoinsaturados son los más utilizados, ya que presentan ventajas respecto a las grasas saturadas o parcialmente hidrogenadas por cuestiones relacionadas con la salud, y también respecto a los aceites poliinsaturados, por cuestiones de estabilidad y calidad sensorial (Sakurai y col., 2003; Kristott, 2002; Brinkman, 2000; Stevenson y col., 1984). El uso de mezclas de aceites es una posibilidad real para conseguir una mayor flexibilidad en la disponibilidad de los mismos.

Tabla 2. Composición (%) de los ácidos grasos mayoritarios de los aceites más utilizados en fritura (Pantzaris, 1999; Souci, 1994).

Aceite de oliva	Aceite de girasol	Aceite de soja	Aceite de maíz	Aceite de algodón	Aceite de colza	Aceite de cacahuete	Aceite de coco	Palmiste	Aceite de palma	Oleína de palma
							7,6	4,75		
C _{8:0}							5,75	3,80		
C _{10:0}							44,9	44,80		0,3
C _{12:0}				1,18		0,23	17,15	15,25	0,96	1,05
C _{14:0}		9,60	10,25	22,00	4,05	9,85	8,60	8,10	41,55	40,55
C _{16:0}	10,66	0,50	0,50	0,940	0,60				0,50	0,20
C _{16:1}	1,23	4,30	2,15	3,60	1,45	3,05	2,60	2,40	4,75	4,25
C _{18:0}	2,40	20,40	28,45	17,75	58,55	53,65	6,70	13,80	37,05	41,85
C _{18:1n-9}	72,35	54,20	52,25	48,80	19,70	21,55	1,65	2,40	10,10	11,55
C _{18:2n-6}	8,05	7,70	0,93	0,74	9,15				0,50	0,35
C _{18:3n-3}	0,85	0,39	0,50		0,49	2,40			0,50	0,4
C _{20:0}	0,41				4,45	1,40				
C _{20:1}						2,90				
C _{22:0}					0,53					
C _{22:1}					0,60	1,40				
C _{24:0}										

¹ C_{8:0} (ácido caprílico), C_{10:0} (ácido caprílico), C_{12:0} (ácido láurico), C_{14:0} (ácido mirístico), C_{16:0} (ácido palmítico), C_{16:1} (ácido palmitoleico), C_{18:0} (ácido esteárico), C_{18:1n-9} (ácido oleico), C_{18:2n-3} (ácido linoleico), C_{18:3n-3} (ácido linolénico), C_{20:0} (ácido araquídico), C_{20:1} (ácido eicosenoico), C_{22:0} (ácido behénico), C_{22:1n-9} (ácido erúcico), C_{24:0} (ácido lignocérico).

Los aceites para fritura deben ser frescos y sujetos a criterios de calidad, como los que se recogen en la Tabla 3. Independientemente de la naturaleza del aceite o grasa usada en el proceso, su calidad puede tener una gran influencia en la calidad del producto frito y en la estabilidad del aceite a elevadas temperaturas (Dobarganes y col., 2002).

Tabla 3. Especificaciones básicas para el aceite de fritura (Dobarganes y col., 2002; Brikmann, 2000; Rossell, 1998).

Criterio	Especificación
Color (unidades Lovibond rojo)	2,0 máx., claro
Gusto	Ninguno
Flavor (sabor)	Ninguno
Ácidos grasos libres	0,1 % máx.
Índice de peróxidos	1-2 meqO ₂ /Kg
Punto de humo	200-220 °C mín.
Humedad	0,05-0,1 % máx.
Ácido linoleico	2-3 % máx.

Transporte, envasado y condiciones de almacenamiento del aceite.

El aceite se transporta en cubas metálicas que suelen ser de acero inoxidable evitando la presencia de cobre con la finalidad de evitar la oxidación auto-catalítica. Durante el transporte, el aceite puede estar en contacto con un mayor espacio de aire pudiendo absorber un mayor contenido de O₂, favoreciendo la autooxidación (Hammond, 2002). Por ello, los tanques de almacenamiento suelen presentar sistemas para saturar de N₂ el espacio en cabeza del tanque.

Los aceites líquidos deben ser guardados a temperatura inferiores a 30 °C y no deberían ser almacenados a temperaturas superiores a 40 °C, mientras la temperatura de manipulación de grasas sólidas o semisólidas debe ser superior a su punto de fusión, pero sin excederlo en más de 5 °C (Gupta, 2005).

La naturaleza del producto frito y la interacción con el aceite de fritura.

El producto frito puede ceder diversos componentes (ej. compuestos con capacidad emulgente, trazas de metales, ácidos grasos libres) al aceite de fritura aumentando así la formación de espuma o causando un humo excesivo, por lo que exige también un cierto control (Dobarganes y col., 2000a, Quaglia y col., 1998).

La evaluación de la calidad del aceite de fritura durante su uso.

Aunque se han ensayado diferentes métodos analíticos estandarizados (constante dieléctrica, tests rápidos, Rancimat,...) para evaluar la estabilidad del aceite y la calidad y estabilidad del producto frito (White, 1991; Löliger, 1989), es la determinación de la acidez el parámetro de control más usado en la industria. Este parámetro hidrolítico está relacionado con el punto de humo, pero no da una idea global de la calidad del producto y de la alteración inducida (Warner, 2004; Hammod, 2002; Morton y Chidley, 1988). El problema de la fabricación a gran escala es determinar diversos parámetros básicos de control rutinario durante el proceso de fritura y seleccionar límites arbitrarios de los mismos para mejorar la eficiencia de la producción, sin perjudicar por otra parte los requerimientos específicos de calidad de los productos fritos (Banks, 1996).

Equipamiento industrial para la fritura.

Las empresas de fritura intentan conceder una atención extrema a diversos aspectos del equipamiento de fritura para minimizar los efectos conocidos sobre la alteración del aceite de fritura, manteniendo elevados rendimientos de producción, de una calidad homogénea, durante un día de trabajo (10 a 24 horas). Algunos de los factores relacionados con el diseño, los cuales pueden tener un efecto destacable en el periodo de utilización del aceite de fritura, son los siguientes (Gupta y col., 2004; Kochhar, 1999; Morton y Chidley, 1988):

- Construcción en acero inoxidable de un cierto grado de calidad, evitando el cobre y el latón.
- Optimización de las dimensiones y del diseño para proporcionar a la masa del aceite una mayor superficie de contacto con el producto a freír.
- Control de la entrada de aceite y su circulación para evitar puntos muertos.
- Filtración para eliminar continuamente los posos.
- Minimizar la aireación del aceite caliente durante el bombeo.
- Eliminación eficiente de humos y condensaciones.
- Calentamiento homogéneo del sistema para evitar los puntos calientes.
- Limpieza fácil de filtros.
- Control estricto de temperaturas y tiempo de fritura.
- Buena conducción del aceite hacia la freidora.
- Uso de intercambiadores de temperatura para reducir rápidamente la temperatura del aceite al final del periodo de trabajo.
- Almacenamiento en condiciones adecuadas del aceite usado.
- Control termostatzado del aceite fresco en tanques.
- Limpieza regular de todo el sistema.

Por tanto, el proceso en continuo garantiza una presencia constante de alimento y un aporte continuo de aceite fresco, las condiciones de fritura no son agresivas y el equipo está continuamente controlado. Este sistema de fritura permite la preparación de productos de elevada calidad para ser conservados durante un cierto periodo, de acuerdo a las especificaciones requeridas (Dobarganes y col., 2002).

II.2.2. Fritura discontinua

Los procedimientos de fritura discontinua pueden subdividirse en dos, en sartén o en freidora. Las características del proceso son radicalmente diferentes, debido a

que las condiciones lo son también (aireación, relación masa producto/masa aceite, tiempo y superficie de contacto, etc.). Sin embargo, el proceso de fritura discontinua más representativo en la industria y en la restauración es la freidora de cuba estática. Las cubas son fabricadas en acero inoxidable y el aceite es calentado directamente por medio de una resistencia eléctrica que se encuentra situada en el interior del recipiente y que está controlada termostáticamente. La temperatura del aceite normalmente queda reflejada en una pantalla y se puede controlar mediante un termómetro de inmersión manual, de forma periódica. La circulación del aceite es ascendente, por convección, pero es ayudada por las propias turbulencias de la ebullición y el movimiento periódico de la cesta donde se encuentra el producto frito. La temperatura usual depende del producto a freír y suele oscilar entre 165-190 °C. Se evita el uso de cobre o latón en la freidora o en cualquier equipamiento para reducir la degradación acelerada por catálisis. La freidora no debe ser sobrecargada con producto, ni el tiempo de fritura debe sobrepasar el conveniente, porque ello puede afectar la calidad del producto de forma adversa. La proporción 6:1 entre masa de aceite y producto es la más usualmente utilizada. El uso de tapas metálicas para cubrir la superficie del aceite caliente reduce la incorporación de oxígeno en frituras que exijan intervalos largos. Los posos pueden originar oscurecimiento del aceite, desarrollo de flavor desagradable, exceso de humo, etc. y, por ello, el aceite debe ser filtrado periódicamente (Morton y Chidley, 1988). El criterio utilizado para desechar el aceite de la freidora es normalmente de tipo observacional, basado en la excesiva formación de humo, en el progresivo desarrollo de espuma persistente e indeseable, y en el oscurecimiento del color del aceite. No obstante, en este sistema discontinuo es aún mucho más necesaria la aplicación de un control basado en parámetros analíticos de alteración química. Recordemos que la legislación española establece un valor límite máximo del 25% para el total de compuestos polares formados (BOE, 1989).

Las diferencias de la freidora respecto a la sartén, como sistema de fritura discontinua, son su mejor regulación de la temperatura y la menor relación superficie/volumen de grasa, y sus inconvenientes se centran en la utilización de gran cantidad de aceite, el calentamiento reiterado de un mismo aceite a elevada

temperatura, y la existencia de una baja velocidad de reposición con aceite fresco (Pérez-Camino y col., 1987).

En conclusión, un sistema de fritura en continuo generalmente presenta una relación de *turnover* rápida, es decir que el aceite se renueva de forma muy rápida en la cuba de elaboración. En estas circunstancias, los niveles de compuestos polares suelen estar muy por debajo del 25%. En contraste, el proceso discontinuo se caracteriza por una producción del producto frito según la demanda destinada al consumo inmediato. Además, la degradación es mucho más elevada, debido a los ciclos de enfriamiento-calentamiento, y los periodos en los cuales el aceite es calentado sin presencia de producto a freír. La relación de *turnover* es muy lenta, y ello provoca la presencia de un aceite residual cada vez más alterado, que debe ser reemplazado en el momento adecuado. Por otra parte, la menor automatización dificulta un control de calidad simple y rápida. Estas diferencias explicarían, en parte, el elevado porcentaje de muestras con elevados niveles de compuestos polares que se observan cuando se analizan muestras reales tomadas en sistemas de fritura discontinua (Dobarganes y Márquez-Ruiz, 1998; Dobarganes y Márquez-Ruiz, 1995; Al-Kahtani, 1991).

II.3. ALTERACIONES EN LA COMPOSICIÓN DEL ACEITE DE FRITURA

La fritura es un proceso de naturaleza muy compleja, en la que se ven implicadas numerosas reacciones que afectan a los componentes de la materia grasa que se utiliza como medio de fritura (Gertz, 2000; Orthofer y col., 1996; Fedeli, 1988), tanto los componentes mayoritarios (TG), como los componentes del insaponificable (esteroles, tocoferoles, carotenos, etc.). A partir de tres agentes (agua, oxígeno y temperatura elevada), que actúan favoreciendo diversas reacciones, los componentes de los aceites sometidos a fritura experimentan diversas alteraciones tal como recoge la siguiente tabla (Tabla 4):

Tabla 4. Principales grupos de compuestos formados en los aceites y grasas durante el proceso de fritura (Dobarganes y col. 2002; Gertz, 2000; Gertz y col., 2000).

Tipo de alteración	Agente causante	Compuestos nuevos resultantes
Hidrolítica	Humedad	Ácidos grasos libres Diacilgliceroles Monoacilgliceroles
Oxidativa	Aire	Monómeros oxidados (TG) Dímeros y polímeros oxidados (TG) Compuestos volátiles (aldehídos, cetonas, hidrocarburos, etc.) Óxidos de esteroides
Térmica	Temperatura	Dímeros y polímeros no polares (TG) Monómeros cíclicos (TG) Isómeros <i>trans</i> (TG) y de posición

Comentaremos a continuación los productos de alteración más relevantes y que han sido motivo de mayor número de estudios.

II.3.1. Ácidos grasos libres

La reacción del agua con el aceite durante la fritura conduce a la liberación de ácidos grasos y ésteres parciales del glicerol, a partir de los triacilgliceroles (ver Figura 1).

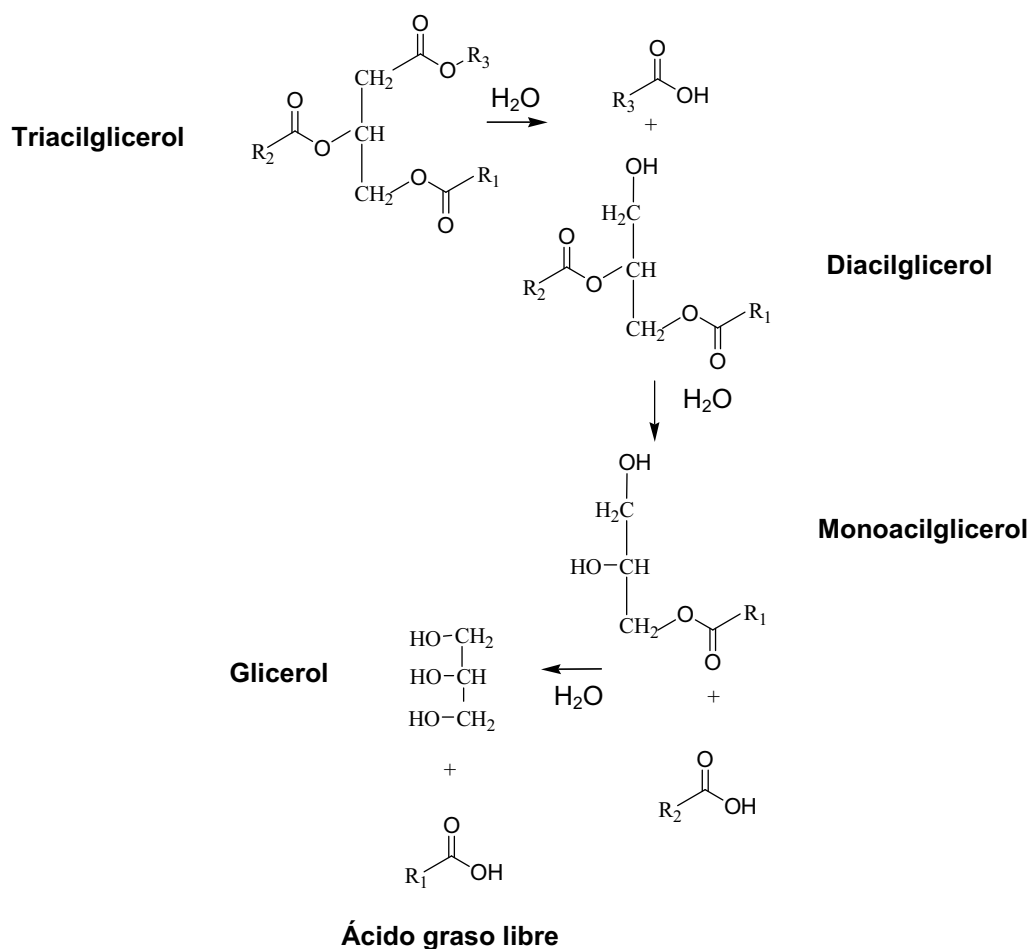


Figura 1. Alteración hidrolítica (Perkins, 1996).

Los derivados de hidrólisis, es decir, ácidos grasos libres, mono y diacilgliceroles, aunque no son muy relevantes desde un punto de vista cuantitativo (2,5-4% de acidez en aceites desechables), presentan una velocidad de oxidación y reactividad generalmente superior a la de los triacilgliceroles de origen, por lo que se facilita la alteración en general. La intensidad de este proceso de hidrólisis, que puede medirse mediante la acidez libre, depende de diversos factores (McSavage y Trevisan, 2001; Handel y Guerrieri, 1990):

- La cantidad de agua en contacto con el aceite o grasa de fritura. El agua se introduce a través del producto que se sumerge para freír y, por lo tanto, la humedad relativa del alimento es un factor clave, que en el caso de la patata puede llegar a ser del 80%.
- La superficie del alimento sumergido, o mejor dicho, la relación

superficie/volumen de producto. A mayor valor de esta relación, mayor contacto entre el aceite y el agua del producto.

- La temperatura de fritura. Una temperatura elevada favorece la formación de ácidos grasos libres (AGL).
- La presencia excesiva de partículas sólidas residuales en el aceite de fritura acelera la formación de ácidos grasos libres. En cambio, la formación de espuma en la superficie del aceite minimiza esta reacción hidrolítica.

El desarrollo de la acidez libre en el aceite sigue un curso paralelo al de otras reacciones de alteración durante la fritura (Orthofer y Cooper, 1996b). Por ello, dicha acidez suele ser un parámetro muy utilizado para el control de los aceites usados en la cuba de fritura. Los ácidos grasos libres son además un factor negativo, pues favorecen la formación de humo.

II.3.2. Compuestos de oxidación primaria

Un primer tipo de compuestos derivados de la oxidación de los ácidos grasos insaturados (AGI) y de otras moléculas insaturadas son los hidroperóxidos (HP) que son los compuestos de oxidación primaria más característicos y abundantes, y que su estructura vendrá determinada por la mezcla de ácidos grasos (especialmente los poliinsaturados) presentes en el aceite de fritura (Frankel, 1998; Min, 1998).

La oxidación transcurre a través de reacciones en cadena, mediadas por radicales libres en un proceso complejo en el cual intervienen los radicales libres y el oxígeno.

A las temperaturas de fritura, la oxidación de los ácidos grasos depende de la concentración de oxígeno en estas grasas calentadas, convirtiéndose la disponibilidad del oxígeno en un factor limitante. Por ello, a temperatura de fritura, los hidroperóxidos existen de una forma transitoria debido a su baja termoestabilidad y se descomponen en productos volátiles y no volátiles (Frankel, 1998; Warner, 1998). Los dos mecanismos que han sido postulados para la oxidación a altas temperaturas de las grasas insaturadas son:

- descomposición térmica por interacción entre radicales libres, cuando los ácidos grasos insaturados son continuamente calentados a elevadas temperaturas.
- descomposición inducida a través de la formación de hidroperóxidos a partir de ácidos grasos insaturados cuando son sujetos a calentamiento intermitente. Bajo estas condiciones, los hidroperóxidos se acumulan a bajas temperaturas contribuyendo a la formación de radicales cuando los aceites son recalentados; por ello se considera la fritura discontinua más destructiva que la fritura continua.

Sin embargo, la naturaleza inestable de los radicales libres y de los hidroperóxidos a la temperatura de fritura, les resta relevancia por sí mismos y sólo debemos contemplar su papel como intermediarios de reacción (Stevenson y col., 1984; Fritsch, 1981).

Sin embargo son el punto de partida de la formación de numerosos compuestos de alteración (dímeros, monómeros cíclicos, compuestos carbonílicos, alcoholes, hidrocarburos, etc.) (Warner, 1998; White, 1991).

II.3.3. Compuestos no volátiles de oxidación secundaria

Los compuestos no volátiles de oxidación secundaria son productos formados durante el proceso de fritura, como consecuencia de diversas reacciones sufridas por los peróxidos lipídicos (Figura 2).

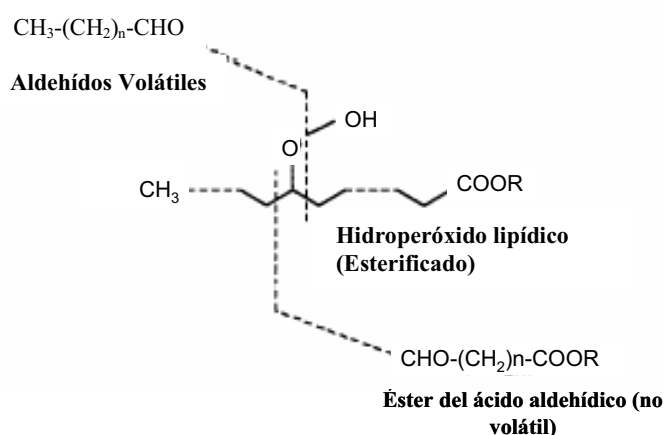


Figura 2. β -escisión de un éster de hidroperóxido a un aldehído volátil y a un éster de un ácido aldehídico (Kamal-Eldin y col., 1997).

Los peróxidos pueden sufrir reacciones de fisión, formando alcoholes, aldehídos, ácidos e hidrocarburos, o bien reacciones de deshidratación que forman cetonas, mientras los radicales peroxilo pueden también dar lugar a la formación de dímeros, trímeros, epóxidos, éteres, etc., compuestos de elevado peso molecular indicadores fiables de la alteración de la grasa debido a su acumulación (Stevenson y col., 1984; Fritsch, 1981). Muchos de ellos son productos no volátiles, que permanecen por tanto en el aceite y cuya concentración determina el cambio de numerosas propiedades físicas, como el color, la viscosidad, la constante dieléctrica, la capacidad de formar espuma (Stevenson y col., 1984). La formación de diferentes tipos de compuestos secundarios estará en relación con la naturaleza y proporción de los ácidos insaturados presentes en el medio de fritura. El conocimiento de los niveles de derivados lipídicos no volátiles en la grasa de fritura y producto frito es de gran importancia, ya que son retenidos en el aceite y, por tanto, serán absorbidos por los productos fritos y llegarán al consumidor (Kamal-Eldin y col., 1997; Smith y col., 1986). Es precisamente esta estabilidad y evolución en el tiempo en el aceite usado y el producto frito lo que los convierte en parámetros muy útiles para el control del desarrollo de las reacciones oxidativas durante la fritura. En consecuencia, se determinan mediante diferentes métodos los cambios físicos (ej. la viscosidad, el color, el punto de humo), o los cambios químicos (ej. el incremento en ácidos grasos libres, el aumento en compuestos de naturaleza carbonílica como aldehídos y cetonas, el aumento del índice de hidroxilo o el aumento en la formación de compuestos de elevados peso molecular) (White, 1991; Melton y col., 1994).

II.3.4. Compuestos volátiles de oxidación secundaria

Los compuestos volátiles de oxidación tienen una gran repercusión desde el punto de vista sensorial y son los responsables del aroma propio (a bajas concentraciones), así como del olor a rancio y de posibles aromas y gustos no deseables de los aceites de fritura utilizados y de los productos fritos en los mismos (Melton y col., 1994; Pangloli y col., 2002). Por esta razón, su caracterización es importante, tanto para el conocimiento de las reacciones que se producen en la fritura como para la calificación de estos productos, aunque su significación como posibles compuestos nocivos para el organismo es poco

importante, ya que su concentración en el aceite suele ser siempre baja. Por otra parte, algunos compuestos volátiles de oxidación forman parte del flavor característico de los alimentos sometidos a fritura y el conocimiento del mismo puede permitir el desarrollo de flavor de fritura en productos no sometidos a la misma. Entre ellos destacan algunos hidrocarburos, alcoholes, aldehídos y cetonas y, en menor proporción, los furanos y ácidos carboxílicos (White, 1991).

La determinación de los compuestos volátiles se realiza principalmente mediante cromatografía de gases, ya sea directa o bien mediante espacio en cabeza estático o dinámico (Perkins, 1996; Takeoka y col., 1996; Snyder y col., 1986). Mediante el análisis cromatográfico de muestras con elevado contenido graso se determinan los compuestos volátiles más estables que permanecen en la grasa después de ser sometidos a diferentes tratamientos, siendo en el aceite de fritura la mayor parte provenientes de la descomposición de productos de oxidación lipídica.

Un elevado número de compuestos han sido identificados en aceites calentados o de fritura. Chang y col., (1978) identificaron 220 compuestos volátiles en diversos aceites sometidos a fritura, mientras 26 compuestos fueron identificados en patatas fritas en aceites de colza parcialmente hidrogenados (Melton y col., 1993)

Su concentración se incrementa con el tiempo de fritura y su máximo se encuentra a las 70 horas (Perkins, 1996). La Tabla 5 recoge datos de los principales compuestos volátiles formados en la oxidación de aceites vegetales.

Tabla 5. Componentes volátiles ($\mu\text{g}/\text{Kg}$) más abundantes, originados en la oxidación de aceites vegetales (Snyder y Mounts, 1990).

Componente	Maíz IP=3,0	Colza (b.er.) IP=3,5	Soja IP=4,5	Girasol IP=19,6	Girasol (a.ol.) IP=6,7
Propanol	8,9	10,9	4,5	2,8	4,0
Pentano	53,4	39,9	91,9	281,0	134,4
Pentanal	24,0	59,5	44,0	40,1	20,5
Pentanol		4,6		1,6	3,4
Hexanal	85,5	64,0	70,6	118,9	35,0
2-pentenol		5,8	3,6		
2-hexenal	5,7	5,7	6,4	7,3	10,4
2-heptenal	18,4	21,2	30,1	34,8	20,7
Octen-3-ol	0,7	3,1	1,1	1,2	
2,4-heptadienal		60,3	50,0		
Nonanal	3,4	8,6	3,4	1,0	23,8
2,4-decadienal	16,0	14,8	16,4	30,4	24,5

IP = índice de peróxidos; b.er. = bajo en ácido erúxico; a.ol. = alto en ácido oleico.

II.3.5. Monómeros cíclicos de los ácidos grasos

Uno de las principales reacciones que induce el tratamiento térmico intenso que supone la fritura es la ciclación de las moléculas de los ácidos grasos. No obstante, la compleja composición de un aceite (elevado número de ácidos grasos diferentes), así como la dificultad del procedimiento de identificación, ha llevado a que este campo se encuentre en fase de estudio intermedia. No obstante, existen ya muchos trabajos que identifican una amplia serie de monómeros cíclicos de los ácidos grasos en diferentes aceites calentados o sometidos a fritura (Dobson y col., 1996; Le-Quere y Sebedio, 1996; Gardner y col., 1992; Sebedio y col., 1996)

Los aceites vegetales son los más utilizados para la fritura y éstos pueden clasificarse en dos grupos fundamentales, los que contienen ácido linoleico ($\text{C}_{18:2n-6}$) como AGPI mayoritario (oliva, girasol y maíz) y los que contienen proporciones apreciables de AGPI de la serie n-3 (ácido linolénico, $\text{C}_{18:3n-3}$),

aunque en mezcla con elevadas cantidades de ácido linoleico (colza, soja). La superior reactividad del ácido linolénico ha llevado a que las recomendaciones para aceites destinados a la fritura indiquen que no se superen contenidos del 2% de este ácido graso, para asegurar una adecuada estabilidad frente a la fritura (Firestone, 1996). Esta mayor reactividad del ácido linolénico, así como las diferencias estructurales entre los ácidos linoleico y linolénico, hacen que la estructura y concentración de los monómeros cíclicos que se forman en estos aceites dependa de los contenidos respectivos de ambos ácidos grasos en el aceite (Le-Quere y Sebedio, 1996).

Como ya hemos indicado, la elucidación de las estructuras de estos monómeros cíclicos es muy laboriosa y requiere sucesivas etapas de aislamiento, derivatización e hidrogenación, utilizando diferentes técnicas analíticas como la cromatografía, espectrometría de masas y espectrofotometría infrarroja con transformada de Fourier para la identificación. De esta forma, en la actualidad, se han podido ya caracterizar algunos componentes típicos en aceites calentados y de fritura (Sebedio y col., 1989a; Christie y Dobson, 2000; Sebedio y col., 1996). Estas estructuras son siempre penta o hexacíclicas, conteniendo frecuentemente un doble enlace.

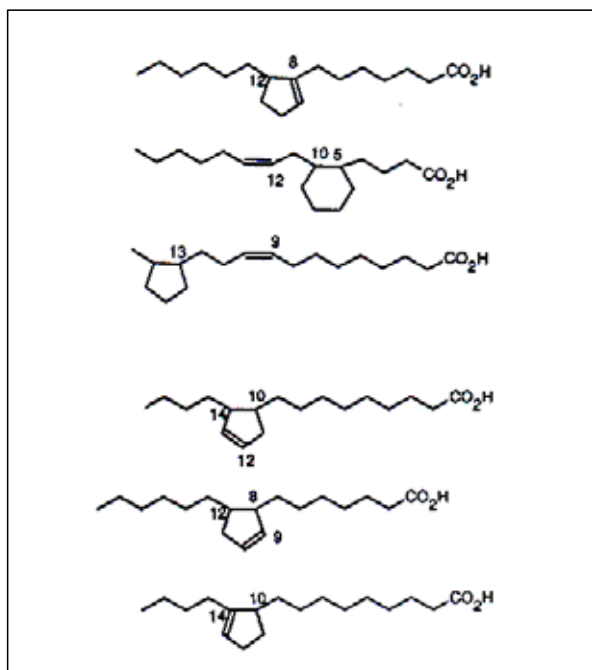


Figura 3. Estructuras correspondientes a monómeros cíclicos de AG, identificados como especies mayoritarias en aceites de girasol calentados (Le-Quere y Sebedio, 1996).

Debido a la complejidad de la elucidación estructural, existen discrepancias entre diversos analistas a la hora de fijar las estructuras definitivas de estos componentes. Igualmente, podemos decir que los procedimientos analíticos para su determinación cuantitativa en un aceite calentado son complejos, y que esta cuantificación generalmente se realiza mediante aislamiento y concentración (por formación de aductos con urea o por HPLC) y determinación por GC/MS. Por esta razón, la reproducibilidad de los resultados no es muy buena y es necesario validar y normalizar dichos procedimientos. A pesar de ello, se han dado ya algunas cifras de contenidos totales de monómeros cíclicos en aceites calentados, que van de 0,2 a 4,6 % (Le-Quere y Sebedio, 1996).

II.3.6. Dímeros y polímeros de los triacilgliceroles

Este grupo de compuestos de alteración, presentes en los aceites de fritura, es el más importante desde un punto de vista cuantitativo y su formación está también catalizada por las altas temperaturas del proceso, debido a que la formación de radicales libres de los ácidos grasos y triacilgliceroles es mucho mayor a elevada temperatura, a consecuencia de hallarse incrementada la descomposición bimolecular de los peróxidos lipídicos (Frankel, 1998; Dobarganes y Márquez-Ruiz, 1996). Por ello, estos compuestos están íntimamente relacionados con la calidad de la grasa y con una pérdida significativa de su valor nutritivo (Márquez-Ruiz y Dobarganes, 1996a).

De esta forma, como puede deducirse de estos mecanismos de formación, los dímeros, trímeros y otros polímeros que irán apareciendo pueden ser de dos tipos, en función de que se combinen radicales oxidados o no oxidados. Así, se clasifican estos compuestos en dos grupos fundamentales, que atienden a la presencia o no de grupos oxidados (Dobarganes y Márquez-Ruiz, 1996):

- Dímeros y polímeros apolares (no oxidados).
- Dímeros y polímeros polares (oxidados)

Dímeros apolares

Las reacciones de polimerización a elevada temperatura pueden seguir también una vía directa a partir de los triacilgliceroles, sin intervención del oxígeno, por ejemplo mediante la reacción de radicales alilo. Se han propuesto diferentes reacciones para la formación de dímeros apolares (Dobarganes y Marquez-Ruiz, 1996):

- la formación de dehidrodímeros por combinación de dos radicales alilo;
- formación de dímeros no cíclicos por adición intermolecular de un radical alilo sobre un doble enlace de una molécula insaturada y posterior estabilización mediante otra molécula insaturada de otro triacilglicerol;
- formación de dímeros cíclicos por adición intramolecular de un radical dimérico sobre un doble enlace de la misma molécula y posterior estabilización mediante la abstracción de hidrógeno a partir de otra molécula insaturada,
- reacción de Diels-Alder entre dos moléculas, una de las cuales actúa como dienófilo que se adiciona a un dieno conjugado de la segunda molécula para formar una estructura ciclohexénica tetrasustituida;

En consecuencia, la diversidad de productos de polimerización resultantes puede llegar a ser muy elevada.

Estudios con modelos experimentales, que emplean mezclas de oleato de metilo y linoleato de metilo (ésteres metílicos de los AG insaturados mayoritarios en los aceites vegetales), así como el aislamiento de componentes a partir de aceites vegetales calentados, han llevado a concluir que las estructuras bicíclicas y tricíclicas intermoleculares y la práctica ausencia de estructuras monocíclicas son las características principales de este grupo de compuestos (Gupta y Scharmann, 1968; Wheeler y White, 1966; Paschke y col., 1964)

Diversos dehidrodímeros formados a través de la reacción de Diels-Alder han sido también identificados (Christopoulou y Perkins, 1989b). La cuantificación de estos dímeros apolares (por GC, o CLAE de exclusión molecular) muestra que son, con toda seguridad, los compuestos de alteración más abundantes en los aceites de

fritura o calentados pudiendo incluso superar hasta el 30% (Dobarganes y Márquez-Ruiz, 1995).

Además, Brütting y Spitteller (1994) proponen la formación de dímeros por un mecanismo no-radicalario basado en la formación de productos por mecanismos catiónicos, siendo el intermedio de reacción estabilizado por efectos mesoméricos y formando posteriormente diversos monómeros, dímeros y polímeros sin presencia del oxígeno como nexa (Figura 4).

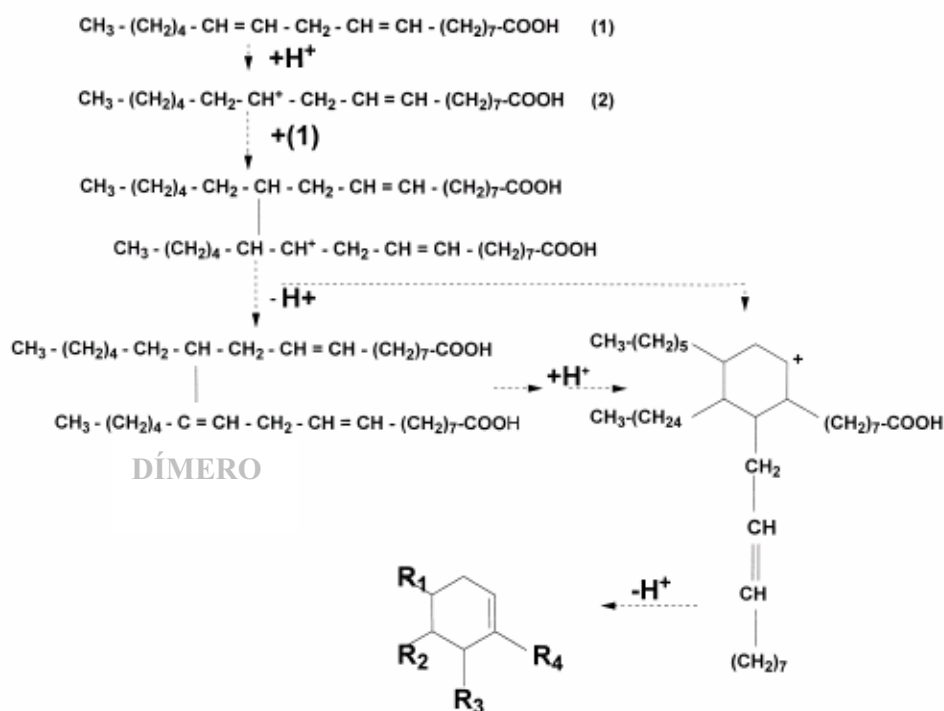


Figura 4. Formación no radicalaria de dímeros y ácidos grasos cíclicos (Gertz y col., 2000).

Dímeros polares

Al contrario que en el caso anterior, a consecuencia de sus mecanismos de formación y de la gran variabilidad de los compuestos de partida, las estructuras de estos dímeros oxidados son aún poco conocidas debido a:

- numerosos grupos que presentan oxígeno (grupos carbonílicos, carboxílicos y éteres) están presentes en monómeros oxidados antes de la formación de dímeros; los dímeros polares también pueden generarse por oxidación de dímeros no polares;

- más de un grupo funcional con oxígeno puede estar presente en el mismo dímero;
- el oxígeno puede o no estar implicado en la unión del dímero.

Por esta complejidad de origen, así como por la diversidad de reacciones posibles, es una familia de compuestos mucho más heterogénea que los compuestos diméricos apolares (Dobarganes y Márquez-Ruiz, 1996).

Estudios que parten de peróxidos de linoleato de metilo (Márquez-Ruiz y col. 1996b; Christopoulou y Perkins, 1989a) parecen confirmar el origen radicalario de esta formación de dímeros polares, pero los mecanismos parecen aún demasiado complejos para una explicación completa, basados en la combinación de radicales intermedios alquilo, alcoxilo y peroxilo. Los ensayos llevados a cabo en aceites, a temperatura de fritura y con aireación, llevaron a concluir la formación de derivados oxidados de uniones C-C, C-O o O-O entre monómeros (Frankel, 1998; Dobarganes y Márquez-Ruiz, 1996).

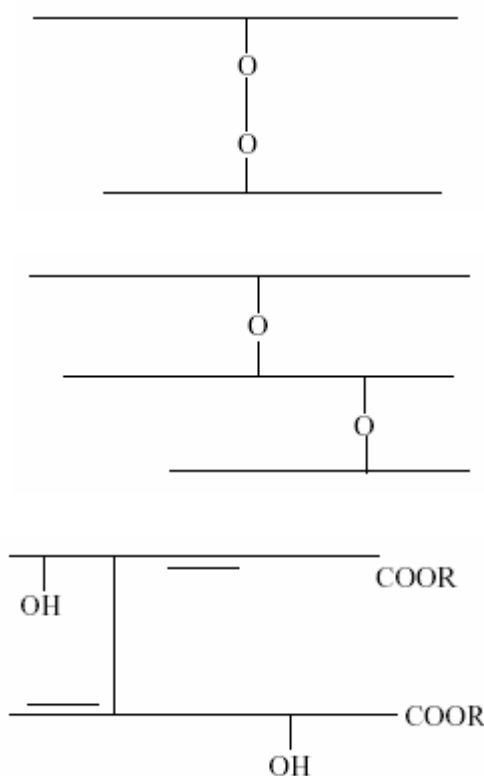


Figura 5. Estructuras de dímeros polares (Chang y col., 1978).

Oligómeros

La caracterización estructural de los polímeros de mayor orden es muy dificultosa, lo que ha conducido a que los trabajos de elucidación de la misma no estén aún muy avanzados y sólo se haya trabajado considerablemente en su determinación conjunta. Estudios de la fracción de los trímeros han mostrado que su peso molecular medio estaría situado en 860, con una media de 3,5 dobles enlaces por molécula y con una proporción de oxígeno superior a la de los dímeros (Perkins y Kummerov, 1959). En cuanto a la fracción polimérica global en aceites sometidos a calefacción (200 °C), diversos estudios han mostrado un intervalo de peso molecular entre 692 y 1790, lo que sugiere una posible mezcla desde trímeros hasta pentámeros (Firestone y col., 1961).

En cuanto a la concentración que podemos encontrar de estos componentes, es muy dependiente de la composición en ácidos grasos del aceite utilizado y de las condiciones de fritura. Dobarganes y Márquez-Ruiz (1995) dan resultados en muestras reales de aceites de fritura desechados, que presentan valores de % de compuestos polares entre 5,8 y 57,7 %, en los cuales el % total de polímeros correspondía a valores de 1,7 a 35 %, respectivamente. Ello pone de relieve la importancia de los polímeros como compuestos mayoritarios, entre los productos de alteración en los aceites de fritura (Dobarganes y Márquez-Ruiz, 1996).

A continuación, la Tabla 6 recoge un ejemplo de interés, relativo a las diferentes proporciones de compuestos de alteración que se generan en un aceite de girasol, en función del tiempo de fritura. No obstante, recordemos que las diferencias en cuanto a condiciones del proceso y composición del aceite pueden hacer variar estas cifras entre márgenes apreciables.

Tabla 6. Determinación de diferentes especies polares en aceite de girasol utilizado para la fritura (Dobarganes y Márquez-Ruiz, 1996).

Muestra	t fritura (horas)	Oligómeros	Dímeros	Monómeros oxidados	Diacil-gliceroles	Ácidos grasos libres	Total Compuestos polares***
TG*	3	2,1	5,7	6,9	2,0	0,7	17,4
EM**	3	0,4	3,2	3,5			7,1
TG	5	5,8	8,6	9,6	2,2	1,0	27,2
EM	5	1,0	5,0	5,2			11,2
TG	8	13,3	12,1	13,0	2,3	0,8	41,5
EM	8	2,5	7,8	8,5			18,8

* TG = determinación directa sobre el aceite; ** EM = determinación después de la transformación en ésteres metílicos;

***Compuestos polares= total de compuestos polares determinados por el método oficial.

II.3.7. Esteroles oxidados

El estudio de los derivados oxidados del colesterol está recibiendo una atención importante en los últimos años, debido a que se han observado numerosos efectos biológicos para estos compuestos. La mayoría de estos efectos son negativos y pueden estar relacionados con ciertas enfermedades cardiovasculares y otras enfermedades degenerativas (García-Cruset y col., 2002, Guardiola y col., 2002). El estudio de la oxidación de los fitosteroles y los posibles efectos nocivos de sus derivados oxidados es mucho más reciente y existen aun escasos estudios (Guardiola, 2004).

En los aceites vegetales sometidos a fritura se observan la presencia de fitosteroles y de sus productos de oxidación, así como la presencia de colesterol y de sus compuestos oxidados cuando se frien alimentos de origen animal. Algunos trabajos (Zhang y col., 1991; Park y Addis, 1986; Lee y col., 1985) han determinado una serie de derivados oxidados del colesterol en grasas y aceites calentados y patatas fritas, entre los que predominan los α y β -epóxidos, los α y β 7-hidroxicolesteroles, el 25-hidroxicolesterol, el 7-cetocolesterol y el colestanol. También se han referido datos de contenidos de óxidos de fitosteroles en aceites de fritura y productos fritos. No obstante, muchos estudios se han realizado en modelos con patrones puros de fitosteroles o de sus ésteres, proceso que presenta diferencias respecto a la fritura real. No obstante, ya comienzan a existir datos de contenidos de óxidos de fitosteroles en productos fritos, sobre todo en

patatas fritas. Dutta (1997) presenta unos niveles de esteroides oxidados en patatas fritas entre 32,0-53,7 mg/Kg de producto frito según el tipo de aceite. Además, un estudio anterior (Dutta y Appelquist, 1996) pone de manifiesto la temperatura de fritura como un factor muy relevante para la formación de estos compuestos oxidados.

A su vez, los fitosteroles muestran un leve aumento en la formación de sus óxidos durante el almacenamiento durante 25 semanas a temperatura ambiente, en patatas fritas en aceites de diferente naturaleza (Dutta y Appelquist, 1997).

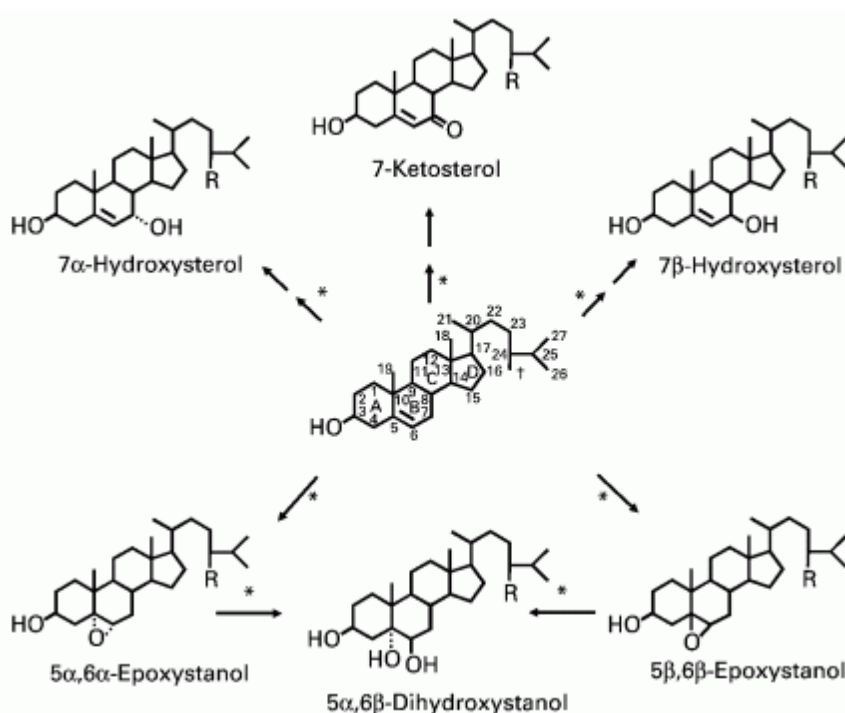


Figura 6. Productos de oxidación de esteroides. R: H, colesterol; CH₃, campesterol; C₂H₅, sitoesterol; C₂H₅, Δ²², estigmasterol. *O₂, O₃, E=hν, T (Lütjohann, 2004).

Diversos autores (Kochhar, 2000; Boskou, 1999; Jadhav y col., 1996;) han descrito la actividad antioxidante de ciertos fitosteroides que contienen un grupo etildieno en su cadena lateral. Esta actividad se atribuye a la formación de un radical alilo en el C₂₉ y posterior isomerización a un radical terciario estable en el C₂₄. Cabe resaltar entre estos fitosteroides con mayor capacidad antioxidante, el Δ⁵-avenasterol, el fucosterol y el citrostadieno.

II.4. ALTERACIONES EN LOS PRODUCTOS FRITOS

II.4.1. Tipos de alteración durante la fritura

Diversos trabajos (Gutiérrez y col. 1988; Dobarganes y col., 2000a; Vitrac y col., 2000; Pokorny, 1998) ponen de manifiesto diversos fenómenos físicos y químicos que ocurren en la matriz del producto sometido a fritura durante este proceso (Figura 7). Entre ellos:

[1] Fenómenos de transferencia o transporte:

- Transferencia de agua del alimento al medio de fritura y posterior evaporación.
- Absorción y adsorción por parte del alimento de compuestos de alteración del aceite, cuya naturaleza ya ha sido descrita anteriormente.

[2] Migración de los componentes lipídicos entre ambos productos en contacto, lo que origina cambios en la composición del alimento.

Ambos fenómenos (1 y 2) dependen de la capacidad de penetración del aceite de fritura, la cual se ve afectada por factores como la temperatura y el tiempo de fritura y por las características del alimento (superficie, estructura, humedad, porosidad, forma).

[3] Transferencia de calor, lo que origina deshidratación e interacciones químicas entre los aceites de fritura y los componentes naturales del producto frito originando sustancias nuevas producidas en el seno del alimento.

[4] Deformaciones mecánicas incluyendo expansiones, disgregación de la matriz sólida, desarrollo de porosidad y de una superficie rugosa.

[5] Reacción de Maillard, degradación de proteínas y reacciones de pirólisis, condensación y polimerización.

[6] Transformaciones fisicoquímicas, como la gelatinización, la retrogradación del almidón, la gelificación de ciertas proteínas, etc.

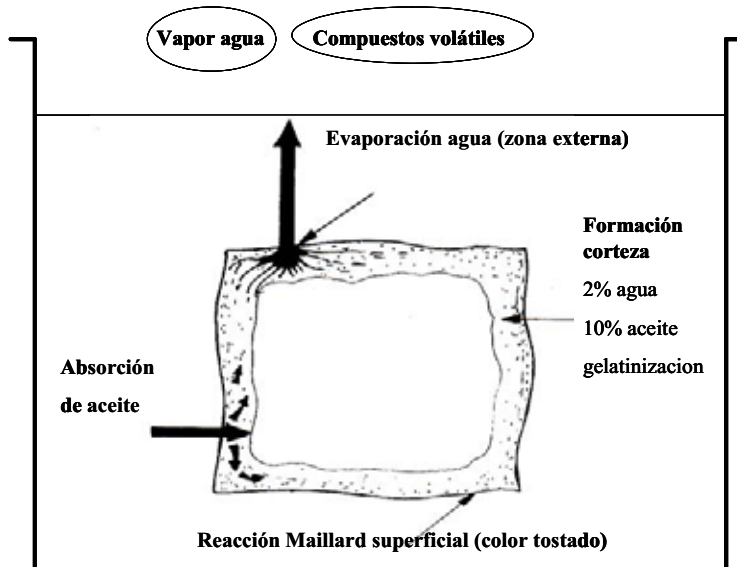


Figura 7. Sección transversal de una patata, que ilustra la estructura y modificaciones ocasionadas durante la fritura (Guillaumin, 1988).

De forma más concreta, en relación con los componentes del alimento, se han descrito las siguientes alteraciones concretas (Pokorny, 1999):

1. Modificaciones de las proteínas, péptidos y aminoácidos. La reacción de desnaturalización afecta a la capacidad de retener agua. También cabe destacar la inactivación de los enzimas por efecto de la elevada temperatura.
2. Modificaciones de los azúcares. La principal reacción de los azúcares es la de Maillard (pardeamiento no enzimático), reacción que se produce entre los grupos amino libre de aminoácidos, péptidos o proteínas y los grupos carbonilo de los azúcares u otros aldehídos o cetonas. Diversos productos intermedios, que reciben el nombre de productos de Amadori, o premelanoidinas, son rápidamente polimerizados a la temperatura de fritura formando macromoléculas de color oscuro (melanoidinas). Este oscurecimiento se acelera a temperaturas superiores a 150 °C. Otros compuestos volátiles se originan como productos secundarios de la reacción y participan en el flavor y aroma del producto frito (pirazinas).
3. Oxidación de la fracción lípida del alimento. Los lípidos presentes en el alimento sometido a fritura son oxidados, debido también a las altas temperaturas, pero con una limitada concentración de oxígeno. Esta oxidación se produce principalmente en la superficie. Los cambios oxidativos del total de

la fracción lipídica dependen de su contenido en ácidos grasos poliinsaturados (Pokorny, 1999).

4. Pérdida de vitaminas. Diferentes vitaminas son sensibles a las temperaturas altas y a la oxidación y su retención en el alimento depende más de la temperatura interior del producto que no de la temperatura de fritura. Dentro del grupo B, la tiamina, la riboflavina, niacina y la vitamina B₆ son las vitaminas más afectadas por este proceso. Biswas y Nannan (1996) refieren la pérdida moderada de vitamina C ocurrida durante la fritura de frutas y vegetales en aceite de soja. También los tocoferoles son inestables frente a la oxidación y, por ello, cabe asumir una pérdida de vitamina E durante la fritura (Warner y col., 2003; Verleyen y col., 2002; Carlson y Tabacch, 1986).
5. Modificaciones en el almidón y los polisacáridos no digeribles (fibra alimentaria). Los gránulos de almidón son rápidamente gelatinizados en contacto con el aceite caliente y la estructura de la patata cruda se pierde y se transforma en una nueva estructura característica. Durante el calentamiento, se forma una corteza crujiente en la superficie, que es muy apreciada por el consumidor. En la superficie de las patatas, donde el agua contenida es menor, la gelatinización no es tan intensa, por lo que los gránulos de almidón retienen más su estructura cristalina (Gómez y col., 1992). Otros polisacáridos de alto peso molecular se modifican durante el proceso de fritura. Los polisacáridos, además, tienen una función en los productos de fritura, ya que dificultan la migración de la grasa en los productos fritos y la pérdida de humedad, debido a la formación de una película en la superficie al inicio de la fritura.
6. Oxidación de compuestos fenólicos durante la fritura. Durante la fritura, estos compuestos con características antioxidantes y quelantes, son fácilmente oxidables. Así mismo, se favorecen sus reacciones con proteínas. Todo ello en conjunto disminuye su concentración y actividad en el producto final.

Tabla 7. Principales modificaciones de la composición de los alimentos durante la fritura (Pokorny, 1998).

Componentes	Cambios experimentados durante la fritura
Grasa	Pronunciado incremento de su contenido
Agua	Perdida sustancial
Azúcares reductores	Reacción Maillard
Almidón	Gelatinización, dextrinización
Proteínas	Desnaturalización
Aminoácidos	Formación de sustancias heterocíclicas del flavor
Sustancias del flavor	Formadas por reacciones oxidativas y de Maillard; Interacción con el aceite de fritura.
Vitamina C	Pérdida moderada
Minerales	Pérdida pequeña
Fenoles	Pérdida moderada

II.4.2. Alteración durante la conservación de los productos fritos

Aunque en los alimentos, los lípidos se pueden oxidar a través de mecanismos enzimáticos y no enzimáticos; en los productos sometidos a fritura el mecanismo no enzimático es prácticamente la única vía, debido a la destrucción de las enzimas a elevadas temperaturas (Nawar, 2000; Pokorny, 1999; Jadhav y col., 1996).

Durante la conservación de los productos fritos se producen procesos de oxidación no enzimáticos, tanto el fenómeno de fotooxidación mediante la participación del oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$) como el de autooxidación mediante la participación del oxígeno triplete ($^3\text{O}_2$). Estos procesos de oxidación influyen sobre la calidad nutritiva del alimento y generan ciertos productos de oxidación potencialmente tóxicos (Riemersma, 2002; Billek, 2000).

La fotooxidación generalmente se da con menor frecuencia (Frankel, 1998), y en los productos de aperitivo y patatas fritas queda generalmente minimizada debido a la utilización de envases opacos, normalmente metalizados que impiden sustancialmente estas reacciones fotoquímicas (Marsh, 2004). Por tanto, la autooxidación se convierte en el mecanismo principal de la aparición de sabores y olores anómalos (Gupta, 2005; Nawar, 2000; Min, 1998).

En este proceso de autooxidación de elevada complejidad en los sistemas lipídicos constituidos por los alimentos, se originan los hidropéroxidos que son productos primarios de autooxidación lipídica relativamente inestables. Éstos participan en numerosas reacciones de elevada complejidad generando un elevado número de compuestos de diferente peso molecular, umbral de percepción y significado biológico y que en conjunto, preocupan a la industria alimentaria (Nawar, 2000).

II.4.3. Sistemas para la prevención de la alteración de productos fritos

Una oxidación excesiva del producto frito, origina rancidez acompañada de una pérdida de palatabilidad y la aparición de sabores y olores no deseables. Por ello, cobra una mayor importancia la presencia de antioxidantes en el medio de fritura, junto con la estanqueidad del envase y el envasado en atmósferas inertes como factores de conservación del producto frito.

II.4.3.1. Antioxidantes

Los antioxidantes son sustancias presentes en bajas concentraciones respecto al sustrato oxidable y que retardan significativamente la oxidación de éste. El antioxidante ideal debe cumplir una serie de criterios para ser utilizado en alimentos:

- seguridad e inocuidad;
- no proporcionar color, olor ni flavor;
- ser efectivos a bajas concentraciones;
- presentes en el alimento acabado; y ser estables en el mismo;
- ser liposolubles y disponibles a bajo precio (Cuppett y col., 1997).

Existen diversas clasificaciones de los antioxidantes. Según su función los antioxidantes se clasifican en (ver Figura 8):

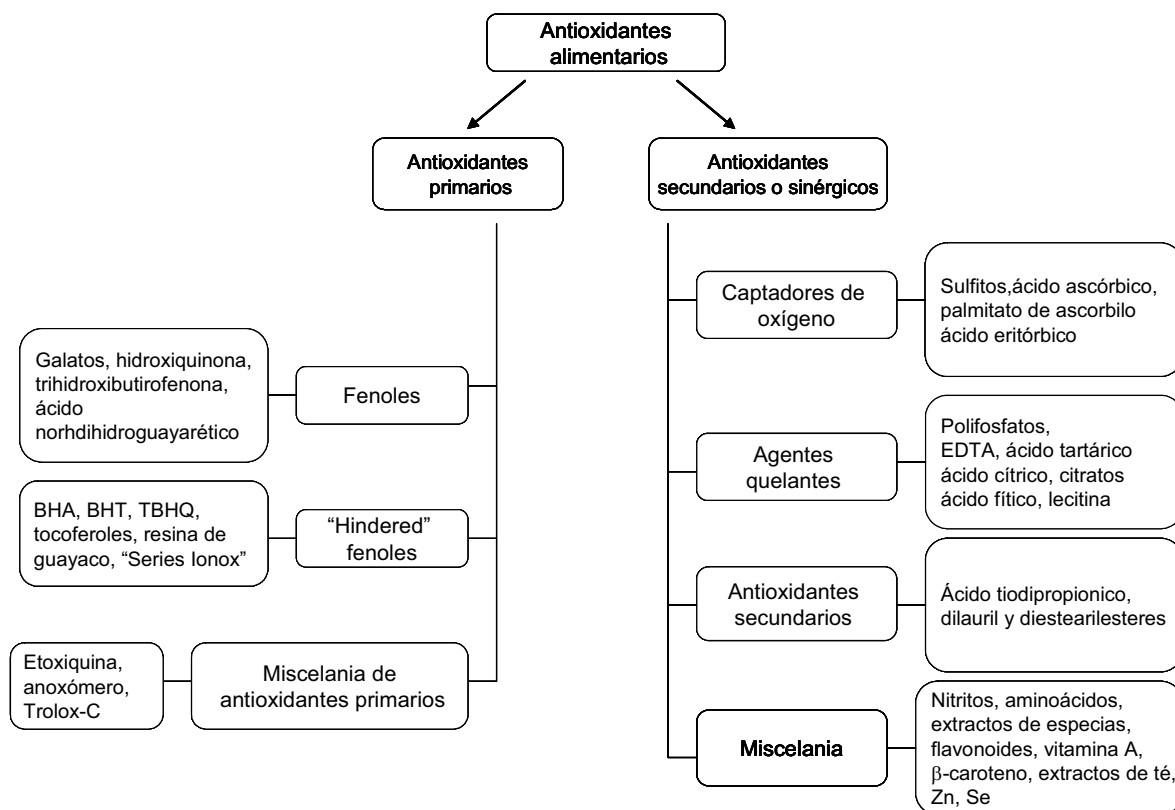


Figura 8. Clasificación de antioxidantes alimentarios (Rajalakshmi y Narasimhan, 1996).

Antioxidantes primarios que suelen ser mono o polifenoles con varias posiciones sustituidas (Reische y col., 1998). La sustitución con grupo dadores de electrones incrementa la actividad antioxidante. Entre ellos, se encuentran los galatos, los tocoferoles, el butilhidroxianisol (BHA) y el butilhidroxitolueno (BHT).

Antioxidantes secundarios o sinérgicos, entre los cuáles se encuentran captadores de oxígeno (ej. el ácido ascórbico o el palmitato de ascorbilo), agentes quelantes (ej. el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), y el ácido cíctrico), y otros compuestos de diferente naturaleza a los que se les atribuye diferentes mecanismos de acción (ej. nitritos).

Antioxidantes primarios

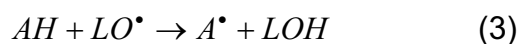
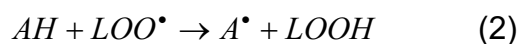
Son aquéllos que deben su capacidad antioxidante a la cesión de átomos de hidrógeno o electrones a radicales libres convirtiéndolos en productos más estables. En este proceso, los antioxidantes se convierten en radicales mucho menos reactivos debido a su capacidad de estabilizar por deslocalización el electrón desapareado sobre su estructura. Además originan complejos lípido-

antioxidante mediante reacciones de adición a radicales lipídicos. Los antioxidantes primarios actúan en diferentes etapas del proceso oxidativo (Yanishlieva y Marinova, 2001; Reische y col., 1998; Min, 1998; Jadhav y col.; 1996):

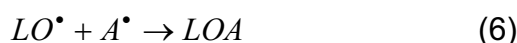
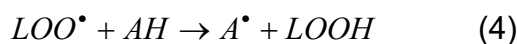
a) Inhiben o retrasan la iniciación de la oxidación reaccionando con radicales alquilo.



b) Inhiben la cadena de propagación reaccionando con radicales peroxilo o alcoxilo.



c) Forman dímeros en etapas de terminación, originando formas no radicalarias que favorecen la finalización de las reacciones en cadena de los radicales libres.



Los antioxidantes primarios son consumidos por los radicales libres generados. Por ello, son efectivos si son adicionados en las primeras etapas de iniciación cuando todavía la etapa de propagación no es significativa. Por otra parte, estos antioxidantes primarios son efectivos a bajas concentraciones y algunos se pueden convertir en prooxidantes a altas concentraciones (Nawar, 2000; Reische y col., 1998; Rajalakshmi y Narasimhan, 1996).

Antioxidantes secundarios o sinérgicos

Los antioxidantes secundarios o sinérgicos son compuestos que actúan impidiendo o disminuyendo la formación de radicales libres por uno o varios de los siguientes mecanismos (Rajalakshmi y Narasimhan, 1996):

- [1] Cediendo electrones o átomos de hidrógeno a radicales de un antioxidante primario y consecuentemente, regenerándolo.
- [2] Facilitando un entorno ácido, lo que aumenta la estabilidad de los antioxidantes primarios
- [3] Quelando iones metálicos, evitando así las reacciones catalizadas por metales.
- [4] Desactivando el oxígeno singulete.
- [5] Captando oxígeno.
- [6] Descomponiendo hidroperóxidos en especies no radicalarias.
- [7] Absorbiendo radiación ultravioleta.

Estas propiedades permiten alargar la vida útil del antioxidante primario y la capacidad antioxidante de las mezclas de antioxidantes primarias y secundarias suele ser superior a la de los componentes por separado (Boskou, 1999; Madhavi y col., 1996)

Por otra parte, según su naturaleza, los antioxidantes se clasifican en (Rajalakshmi y Narasimhan, 1996):

- Antioxidantes naturales
- Antioxidantes sintéticos

Antioxidantes “naturales”

En los últimos años, ha habido un gran aumento del uso de antioxidantes naturales respecto a los sintéticos. La utilización de antioxidantes naturales atrae la atención de muchos fabricantes de productos alimenticios como resultado de la necesidad creada por la situación donde es extremadamente difícil el uso de antioxidantes sintéticos debido a la necesidad de ofrecer alimentos percibidos por los consumidores como más saludables. Debido a esta situación, existe una gran cantidad de antioxidantes naturales, algunos de los cuáles, son utilizados frecuentemente para la protección de alimentos contra la degradación oxidativa (BOE, 2002).

Numerosas sustancias que se encuentran de forma natural en los alimentos son utilizadas para esta aplicación alimentaria, entre ellos podemos encontrar los tocoferoles, tocotrienoles, el ácido ascórbico y los carotenoides, componentes de origen natural muy interesantes, debido a la capacidad de neutralizar los mecanismos radicalarios también *in vivo* (Boschke, 1983; Witting, 1980). La mezcla de ácido ascórbico y tocoferol permite la estabilización de aceites y otros alimentos mediante el intercambio de reacciones radicalarias (Decker, 1998; Jadhav y col., 1996). Este intercambio radicalario se da en un sistema bifásico (aceite/agua), donde en la parte lipídica se encuentra la vitamina E y el substrato lipídico, y en la parte acuosa está presente la vitamina C (Frankel, 1998).

También se utilizan derivados de estos antioxidantes, como el palmitato de ascorbilo que es un éster orgánico del ácido ascórbico que se caracteriza por presentar una mayor solubilidad en aceites. El palmitato de ascorbilo se considera un compuesto con elevada efectividad para la protección de grasas y aceites de fritura y productos fritos (Gwo y col., 1985).

También se incluyen en este grupo, sustancias con capacidad quelante que deben su acción antioxidante a un mecanismo específico de secuestro de los metales libres presentes en el alimento, especialmente del Cu y Fe que catalizan muy eficazmente las reacciones de oxidación lipídica. Algunos de estos aditivos presentan otras funciones, como acidulantes (ej. el ácido cítrico y el ácido tartárico), conservantes (ej. el ácido fítico), o como estabilizantes de emulsiones o agentes antiapelmazantes (ej. el ácido fosfórico y sus derivados) (Lindsay, 2000; Madhavi y col., 1996).

Algunos extractos de plantas (té, avena, romero, salvia, alcachofa, cebolla, etc.) contienen una variedad de compuestos naturales, los cuáles son responsables de su actividad antioxidante. Entre ellos, destaca el extracto de romero (*Rosmarinus officinalis* L.) que debe su actividad antioxidante a compuestos fenólicos como el ácido carnósico, carnosol, rosmanol, epirosmanol, carnosato de metilo (Cuvelier y col., 1996) y otros ácidos fenólicos como el ácido rosmarínico (Frankel y col., 1996a, 1996b). La actividad antioxidante de dicho extracto ha sido comparada con la eficacia del BHA y BHT en ciertos modelos experimentales (Che Man y Tan, 1999; Jaswir y Che Man, 1999).

Otros compuestos presentes en plantas pueden ser adicionados como agentes estabilizantes. Entre ellos, la vainillina que es un agente aromatizante con potencial actividad antioxidante debido a la similitud estructural con la de conocidos antioxidantes fenólicos.

Antioxidantes sintéticos

Este grupo incluye sustancias sintéticas que tienen propiedades antioxidantes y que son usadas en un gran número de aplicaciones no alimentarias, por ejemplo en la estabilización de plásticos, gomas y polímeros para prevenir la degradación oxidativa en dichos materiales. Sin embargo, el uso de antioxidantes sintéticos en alimentos requiere tener en cuenta una serie de consideraciones, incluyendo la necesidad tecnológica, los efectos biológicos de los productos de oxidación lipídica, e indudablemente los estudios toxicológicos realizados para asegurar su inocuidad como aditivo alimentario (Kahl y Kappus, 1993).

Los antioxidantes sintéticos que son usados en diversos países para la estabilización de alimentos contra la degradación oxidativa son el butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), tert-butilhidroxiquinona (TBHQ) y los galatos (entre los cuales destacan los de propilo, octilo y dodecilo). Se tratan de estructuras fenólicas con uno o más grupos fenólicos. La diferencia en su reactividad como antioxidante es debida a su estructura química, que modula la actividad captadora de radicales por parte del grupo fenólico y sus propiedades físicas, entre las que destacan la volatilidad, solubilidad y estabilidad térmica (Löligler, 1991).

La legislación europea ha ido restringiendo en los últimos años la utilización de ciertos antioxidantes en alimentos como es el caso de la prohibición de la utilización del TBHQ existiendo una tendencia a su sustitución por antioxidantes “naturales”.

Antioxidantes utilizados en este estudio.

Durante la fritura, el aceite está expuesto a elevadas temperaturas en presencia de oxígeno. Como resultado se producen cambios químicos tanto en el aceite de fritura como en el producto frito, originándose productos de alteración que afectan a la calidad del aceite y del producto frito (ver capítulo II.3). Por ello, la utilización de antioxidantes en la fritura es una práctica permitida con la finalidad de retrasar la oxidación lipídica (Jaswir y Che Man, 1999). Esta oxidación lipídica es una de las principales reacciones deteriorativas de los aceites de fritura y de los productos fritos (Wu y Nawar, 1986).

La efectividad de la adición de antioxidantes depende no solamente de sus características estructurales (ej. su reactividad química respecto a los radicales libres), sino también depende de otros factores como la concentración, la temperatura, el tipo de substrato y el tipo de sistema que contiene numerosos microcomponentes con características prooxidantes y/o antioxidantes (Yanishlieva y Marinova, 2001; Márquez-Ruiz y col., 1999).

A continuación, comentaremos algunas propiedades de los antioxidantes utilizados en el estudio que fueron escogidos con arreglo a los siguientes criterios de selección:

- ser un aditivo permitido por la legislación española para la adición en aceites de fritura (BOE, 2002).
- pertenecer a aquellos antioxidantes considerados “naturales”.
- presentar mecanismos de acción con posible efecto sinérgico.

Por ello, se escogieron el ácido cítrico, el palmitato de ascorbilo y un extracto de tocoferoles.

Ácido cítrico

El ácido cítrico es quelante y acidulante (Figura 9).

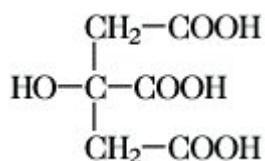
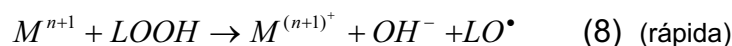
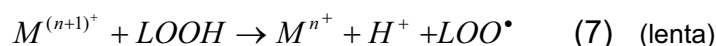


Figura 9. Estructura del ácido cítrico.

Este agente inactiva iones metálicos libres que ejercen un efecto prooxidante debido a su capacidad de promover la iniciación del proceso de autooxidación (formación de radicales alquilo) y la descomposición de hidroperóxidos (reacciones 7 y 8).



Este efecto antioxidante es, por tanto, debido a la formación de compuestos de coordinación con los metales prooxidantes, evitando la iniciación de la oxidación radicalaria por catálisis mediada por un ión metálico (Rajalakshmi y Narashimhan, 1996).

El ácido cítrico muestra una baja solubilidad en aceites vegetales, por ello en ciertas ocasiones, como en este trabajo, se vehicula mediante propilenglicol (Madhavi y col., 1996), y su efectividad como antioxidante en aceites vegetales se encuentra incrementada por una acción sinérgica con los tocoferoles presentes de forma natural en el propio aceite o con otros antioxidantes adicionados. El ácido cítrico puede secuestrar los iones metálicos presentes en el medio aportando un mayor efecto de estabilización del resto de antioxidantes.

El ácido cítrico es un antioxidante efectivo en el retraso de la degradación oxidativa de los lípidos y es comúnmente adicionado a concentraciones inferiores a 50 mg/L en aceites vegetales después de desodorizarlos. Esto es debido a que

su adición antes de la desodorización origina su descomposición térmica en una mezcla de ácidos orgánicos (aconítico, itanónico y citracónico) que presentan menor efectividad como quelantes. Por esta razón se añade en los aceites vegetales en el proceso de enfriado de la desodorización a temperaturas inferiores a 100 °C (Yanishlieva y Marinova, 2001; Frankel, 1998).

Aunque diversos autores (Jaswir y col., 2000a, 2000b; Che Man y Tan, 1999; Gwo y col., 1985) realizan estudios donde valoran los efectos del ácido cítrico en diferentes aceites sometidos a fritura, Frankel (1998) considera el ácido cítrico como un quelante activo en condiciones normales de almacenamiento de los aceites que se descompone y pierde su efectividad a las elevadas temperaturas de fritura o calentamiento.

Palmitato de ascorbilo

La esterificación del ácido ascórbico con un ácido graso permite una mayor solubilización de este compuesto en medios grasos (Figura 10). El palmitato de ascorbilo presenta una gran efectividad contra la degradación oxidativa en alimentos con elevado contenido en grasas.

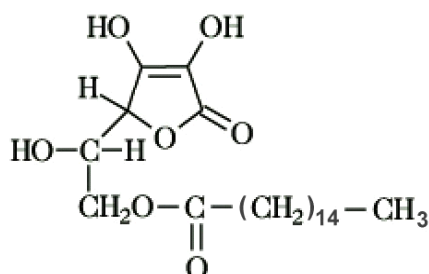


Figura 10. Estructura del palmitato de ascorbilo.

Este éster es capaz de estabilizar la fracción lipídica de los alimentos debido a su función como captador de oxígeno, ya que el ácido ascórbico que forma parte de dicha molécula reacciona con el oxígeno presente disminuyendo su disponibilidad en el sistema (Jadhav y col., 1996; Desphande y col., 1996). Además, puede actuar, principalmente *in vivo*, como donador de electrones o hidrógeno a los antioxidantes primarios, regenerando de esta manera el antioxidante primario, por ello se considera un compuesto con un efecto sinérgico muy efectivo con tocoferoles, lecitina, ácido cítrico y galato de octilo para proteger grasas animales o aceites vegetales (Madhavi y col., 1996).

Diversos trabajos (Önal y Ergin, 2002, Mancini-Filho y col., 1986; Gwo y col., 1985; Cort, 1974) describen una elevada efectividad del palmitato de ascorbilo para proteger los aceites de fritura y el producto frito, ya sea sólo o en combinación con otros antioxidantes. Además, este éster muestra un elevado efecto antioxidante en estudios de estabilidad realizados bajo diferentes condiciones de almacenamiento con productos fritos en aceites con diferente grado de insaturación (Masson y col., 2002; Gordon y Kourimska, 1995).

En estudios de grasas sometidas a temperatura de fritura entre 180-185 °C durante más de 10 días, se obtuvieron porcentaje de recuperación de palmitato de ascorbilo entre 90-96% poniendo de manifiesto su posible actividad incluso en condiciones extremas de elevadas temperaturas y largos tiempos de fritura (Gwo y col., 1985). Gertz y col. (2000) compararon la eficacia de diferentes antioxidantes (2500 mg/Kg) simulando un proceso de fritura durante 2h a 170 °C con aceites poliinsaturados (aceites de colza y girasol) y observaron un mejor comportamiento del palmitato de ascorbilo respecto a otros antioxidantes como galatos, BHT, BHA y α -tocoferol (ver Tabla 8).

Tabla 8. Eficacia de diferentes antioxidantes en la estabilidad oxidativa del aceite de girasol refinado y aceite de colza refinado (Gertz y col., 2000).

	Aceite de girasol		Aceite de colza	
	PTG ^a	OSET ^b	PTG ^a	OSET ^b
control	4,7	21	2,26	44
α -tocoferol	5,47	18	3,03	33
BHA ^c	4,63	22	2,26	44
Acetato de tocoferol	4,63	22	2,00	50
Ácido <i>trans</i> ferúlico	4,54	22	2,00	50
Succinato de tocoferol	4,52	22	1,91	52
BHT ^c	4,23	24	1,86	54
Galato de propilo	4,02	25	1,84	54
Galato de dodecilo	3,93	25	1,82	55
Palmitato de ascorbilo	3,28	30	1,42	70

^a porcentaje de polímeros de triacilglicerol.

^b Estabilidad oxidativa a elevadas temperatura.

^c BHA (butilhidroxianisol), BHT (butilhidroxitolueno).

Desde el punto de vista bioquímico y fisiológico, el palmitato de ascorbilo puede ser fácilmente hidrolizado en el tracto gastrointestinal y absorbido como ácido ascórbico y ácido palmítico, los cuáles son sustancias inocuas y de presencia habitual en los alimentos.

Tocoferoles

Los tocoferoles están considerados los antioxidantes naturales por excelencia, por su presencia en todas las grasas y aceites. Los tocoferoles actúan como antioxidantes a través de dos mecanismos:

1. Atenuando la etapa de propagación de la autooxidación debido a que compiten como sustrato de oxidación con el ácido graso insaturado por los radicales libres, y originan su propio radical que se estabiliza por resonancia (Figura 11).

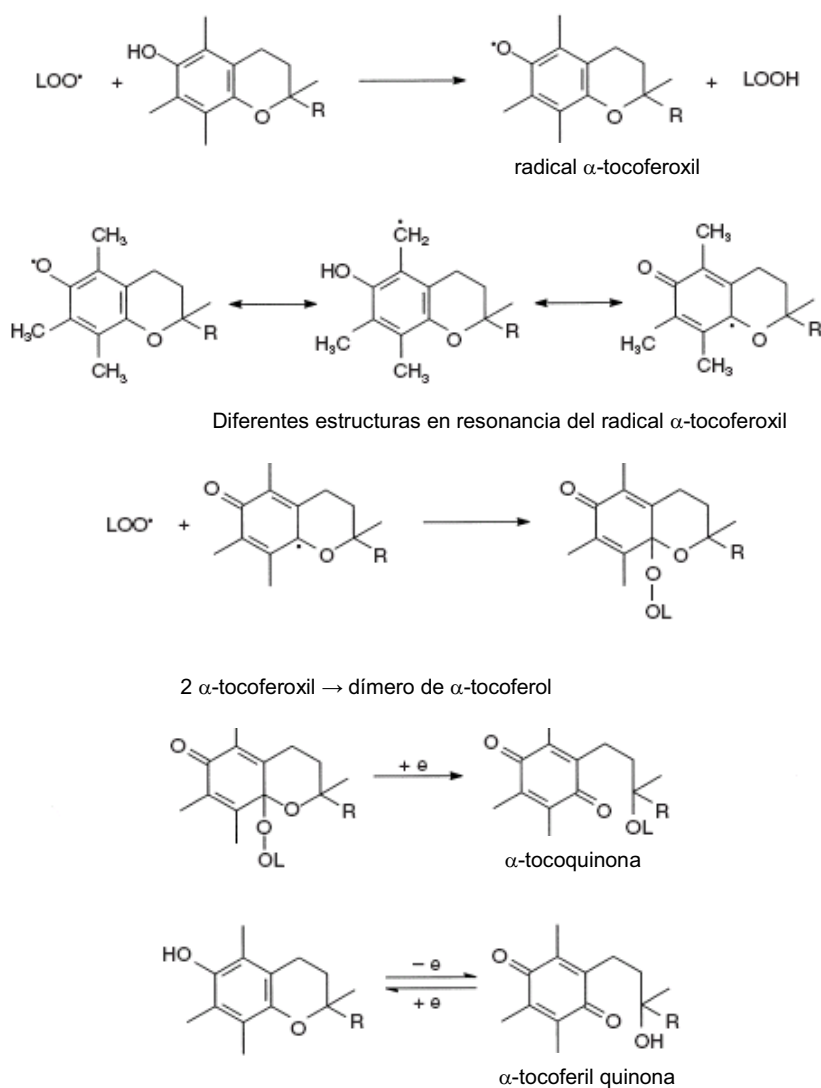


Figura 11. Oxidación del α -tocoferol a tocoferilquinona (Yanishlieva, 2001).

- Alargando el periodo de inducción y reduciendo el grado de oxidación en función de la temperatura, mediante una unión irreversible al oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) y originando una variedad de productos de oxidación del tocoferol (hidroperoxidienona u otros endoperóxidos) (ver Figura 12).

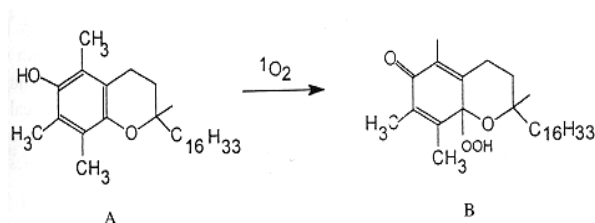


Figura 12. Oxidación del α -tocoferol (A) a hidroperoxidienona (B) mediante el oxígeno singlete (Cupett y col., 1997).

Los distintos compuesto con actividad vitamínica E pueden clasificarse en tocoferoles y tocotrienoles (Cupett y col., 1997), en cada grupo encontramos cuatro homólogos estructurales α , β , γ y δ (ver Figura 13).

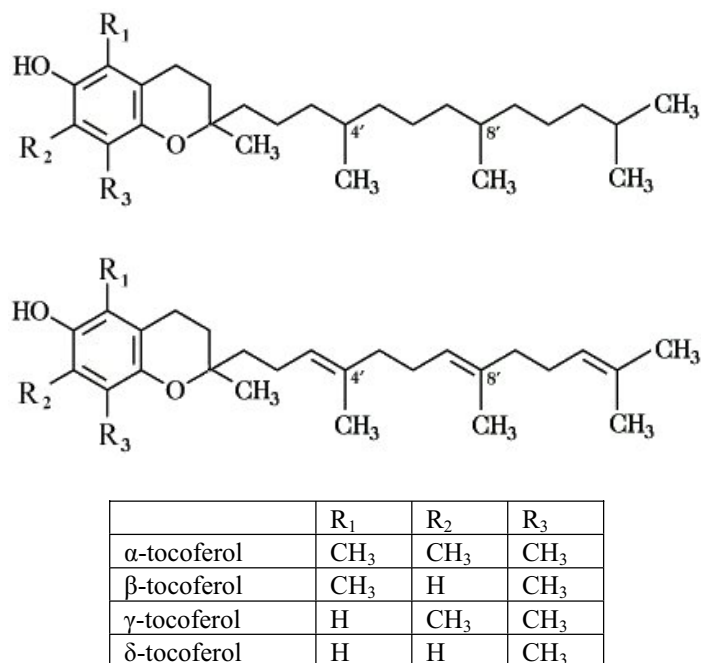


Figura 13. Estructuras de los tocoferoles (arriba) y tocotrienoles (abajo).

La actividad antioxidante varía según la temperatura. A 37 °C el orden de la actividad antioxidante de los homólogos estructurales es similar a su actividad biológica $\alpha > \beta > \gamma > \delta$, en cambio a temperaturas elevadas (ej. 50-100 °C) se invierte el orden $\delta > \gamma > \beta > \alpha$ (Kochhar, 2000; Prongracz y col., 1995; Gordon y Kourimska, 1995). Esto puede ser debido en el caso del γ -tocoferol a que sus productos de oxidación son más estables y presentan capacidad antioxidante mientras el α -tocoferol se degrada más rápidamente formando 4 productos de reacción de los cuales sólo uno muestra actividad antioxidante (Kochhar, 2000).

Los tocoferoles pueden comportarse como antioxidantes o prooxidantes según su concentración, la naturaleza y el estadio de oxidación del medio. Frankel y col. (1994), en estudios en sistemas bifásicos con presencia de aceite de maíz, proponen la concentración de 100 mg/L de α -tocoferol como concentración más efectiva para inhibir la formación de hidroperóxidos mientras que a concentraciones mucho más elevadas, de 750-1000 mg/L, el α -tocoferol parece tener una actividad prooxidante.

El efecto de los tocoferoles naturales o su adición en aceites y grasas de fritura es controvertido. Los tocoferoles se consideran generalmente poco efectivos como antioxidantes a elevadas temperaturas, e incluso podrían tener un efecto prooxidante (Frankel, 1998). Sin embargo, numerosos estudios han utilizado diferentes homólogos de los tocoferoles solos o en combinaciones con otros antioxidantes mostrando especialmente efectividad el γ -tocoferol en la estabilización de aceites de fritura y productos fritos almacenados bajo diferentes condiciones (Warner y col., 2003; Kochhar, 2000; Gordon y Kourimska, 1995), llegando a ser comparada la efectividad de este homólogo con la de estructuras fenólicas sintéticas como el TBHQ o el galato de octilo (Madhavi y col., 1996). Además, Wagner y Elmadfa (1999) recogen la necesidad de evaluar los efectos de los tocoferoles a elevadas temperaturas en procesos industriales.

II.4.3.2. Envasado en atmósferas inertes

El envasado en atmósferas modificadas es un proceso tecnológico basado en la aplicación de una corriente de gas con la finalidad de incrementar la vida útil de diversos productos. La composición de la atmósfera idónea para la conservación depende del tipo de producto y de su composición (Jenkins y Harrigton, 1991).

La técnica se basa normalmente en el empleo de nitrógeno sólo o mezclado con otros gases (Keijbets, 2001). A nivel industrial, el contenido de oxígeno residual para el envasado de productos de aperitivo se sitúa entre el 2-3% siendo estos productos los que presentan un retardo del proceso oxidativo (Marsh, 2004; Warner y col., 1986).

Una reducción en los niveles de oxígeno en el interior del envase proporciona una mayor estabilidad frente a la oxidación. Anon (1988) considera que la aplicación de nitrógeno, sin la utilización de antioxidantes proporciona a las patatas fritas una vida útil de 120 días duplicando los 55 a 65 días que ofrecen sin nitrógeno.

Además, diversos estudios indican un aumento de la frescura durante un periodo más largo en presencia de nitrógeno y, por lo tanto, ello permite distribuir el producto más fácilmente. Otra ventaja de la utilización es que las bolsas resultan

infladas, lo que evita el daño de los productos frágiles, como son los *snacks* y las patatas fritas, durante su manipulación y distribución (Subramaniam, 1995).

La humedad es un factor íntimamente ligado a la vida útil del producto frito de aperitivo en el cual el contenido de humedad se sitúa entre el 1-1,5% cuando se empaquetan, y dependiendo de la permeabilidad del film se puede incrementar hasta una 4-5% de humedad, momento en el cual el producto se convierte en inaceptable (Marsh, 2004). Del Nobile (2000) considera apropiado el uso de materiales de empaquetado con baja permeabilidad al oxígeno y vapor de agua y mediante un modelo teórico estudia las mejores combinaciones de gases, observando un incremento de la vida útil de los productos fritos cuando la presión parcial de agua en el interior de la bolsa tras el envasado es inferior a 0,015 atmósferas.

Las empresas de patatas fritas y productos de aperitivo suelen utilizar el sistema de envasado "*flow-pack*" en el cuál el envase está formado por una lámina de polipropileno, que la máquina conforma y sella para formar el envase. Se caracteriza por una sutura longitudinal en el centro y sendas suturas en los extremos delantero y trasero. Este sistema además de permitir el envasado en atmósferas inertes garantiza la inviolabilidad del empaquetado, altas producciones y una manipulación fácil e higiénica en el punto de venta.

Los productos fritos de aperitivo varían en las necesidades del efecto barrera del envase según sus características, pero existen tres requisitos importantes como son la protección contra la humedad, el oxígeno y la luz (Subramaniam, 1995; Willhoft, 1990). Es por ello, que los materiales del envase son los que más han evolucionado. Dentro de los diversos tipos de plásticos, el polipropileno biorientado metalizado es ampliamente utilizado y confiere una opacidad al envase que protege al producto de la luz, evitando de esta manera, la formación de compuestos de oxidación provenientes de la fotooxidación y mejorando la estabilidad sensorial (Lennersten y Lingert, 1998). Sin embargo, en la actualidad hay una tendencia por parte del consumidor a preferir materiales transparentes (Lennersten y Lingert, 1998). Las combinaciones de films transparentes como polipropileno biorientado con polímeros acrílicos y policloruro de vinilideno son utilizadas por diferentes empresas del sector.

Algunos de estos plásticos presentan aditivos, entre ellos ciertos antioxidantes (fenoles, quinonas, sulfitos) con la finalidad de evitar la degradación de los polímeros que los forman. Algunos de estos antioxidantes, debido a sus características fisicoquímicas, pueden migrar del material de envasado al alimento, convirtiéndose en residuos no deseables (Rajalakshmi y Narasimhan, 1996).

Las bolsas elaboradas en estos materiales, en comparación con las clásicas bolsas de polietileno transparente, presentan mejores características de impermeabilidad al vapor de agua y al oxígeno, lo que aumenta la vida útil del producto frito de manera importante (Cann, 1991).

II.5. EFECTOS TÓXICOS Y BIOLÓGICOS DE LOS ACEITES CALENTADOS Y DE LOS PRODUCTOS DE OXIDACIÓN LIPÍDICA

Se han realizado múltiples estudios en los que se han alimentado animales de experimentación, principalmente ratas, con aceites de fritura, aceites calentados a temperaturas de 175-220 °C en presencia de aire y fracciones alteradas obtenidas a partir de dichos aceites. En la mayoría de estos estudios la cantidad de grasa añadida a la dieta es muy elevada. A pesar de ello, son pocos los estudios que utilizando aceites de fritura observan efectos negativos sobre la salud del animal, únicamente en algunos estudios se observa principalmente un menor crecimiento y/o un ligero aumento del peso del hígado (Stier, 2004; Billek, 2000; Márquez-Ruiz y Dobarganes, 1996a). Cuando se utilizan aceites calentados, los resultados también son controvertidos pero los estudios que muestran un efecto sobre el crecimiento y/o el peso del hígado son un poco más numerosos (Stier, 2004; Billek, 2000; Márquez-Ruiz y Dobarganes, 1996a). En algunos de estos estudios, también se ha observado un aumento del peso de los riñones, de la mortalidad y otros efectos tóxicos. La disminución del crecimiento y el aumento de la mortalidad han sido atribuidos por algunos autores principalmente a la menor digestibilidad que presentan estos aceites debido a su elevado contenido en dímeros y polímeros, lo cual puede conllevar la aparición de diarreas y que se dejen de absorber nutrientes esenciales (Márquez-Ruiz y Dobarganes, 1996a). La aparición de dichas diarreas también viene favorecida por las altas dosis de grasa incorporadas a la dieta del animal. Además, diversos estudios (González-Muñoz y col., 1998, 2003) han demostrado que la digestibilidad de los dímeros y especialmente la de los polímeros es menor que la de los TG inalterados. Como ya hemos comentado anteriormente, también existen estudios en los que las fracciones alteradas de estos aceites se incorporan a la dieta del animal. No obstante, la mayoría de estos estudios que encuentran efectos sobre el crecimiento, la mortalidad y/o el peso del hígado y de los riñones utilizan dosis muy altas. Alrededor de estos estudios existe un cierto consenso en atribuir estos efectos negativos y otros efectos tóxicos a la fracción polar de estos aceites (Stier, 2004; Billek, 2000; Márquez-Ruiz y Dobarganes, 1996a).

Para ilustrar un poco más el tema, de entre los estudios que han sido realizados rigurosamente desde el punto de vista metodológico, comentaremos los que consideramos más significativos. Así, Lang y col. (1978) calentaron aceites de soja y de cacahuete hidrogenado en una freidora de tipo discontinuo a 175 °C durante 10 días (8h cada día) hasta que los compuestos polares llegaron a un 20-25%. Estos aceites también fueron utilizados para freír alimentos en estas mismas condiciones. Los aceites calentados, de fritura y sus correspondientes aceites frescos fueron administrados a ratas durante tres generaciones en un estudio que duró 10 años. La cantidad de aceite incorporada a la dieta fue de un 10%. En estas condiciones, ninguno de los tratamientos ensayados influyó de forma significativa sobre la salud del animal.

Unos años más tarde este mismo equipo de investigación realizó un estudio en el que utilizó un aceite de girasol que se había utilizado para freír filetes de pescado empanados con un contenido aproximadamente del CP del 16% y sus fracciones polares y apolares (Billek y col., 1979). Un 20% tanto del aceite como de sus fracciones se incorporó a la dieta de las ratas durante un año y medio. En este estudio se observó que la fracción polar del aceite de fritura influyó significativamente sobre la disminución del crecimiento y el aumento de peso del hígado y de los riñones (Figura 14). No obstante, estos órganos no presentaron alteraciones desde el punto de vista histológico.

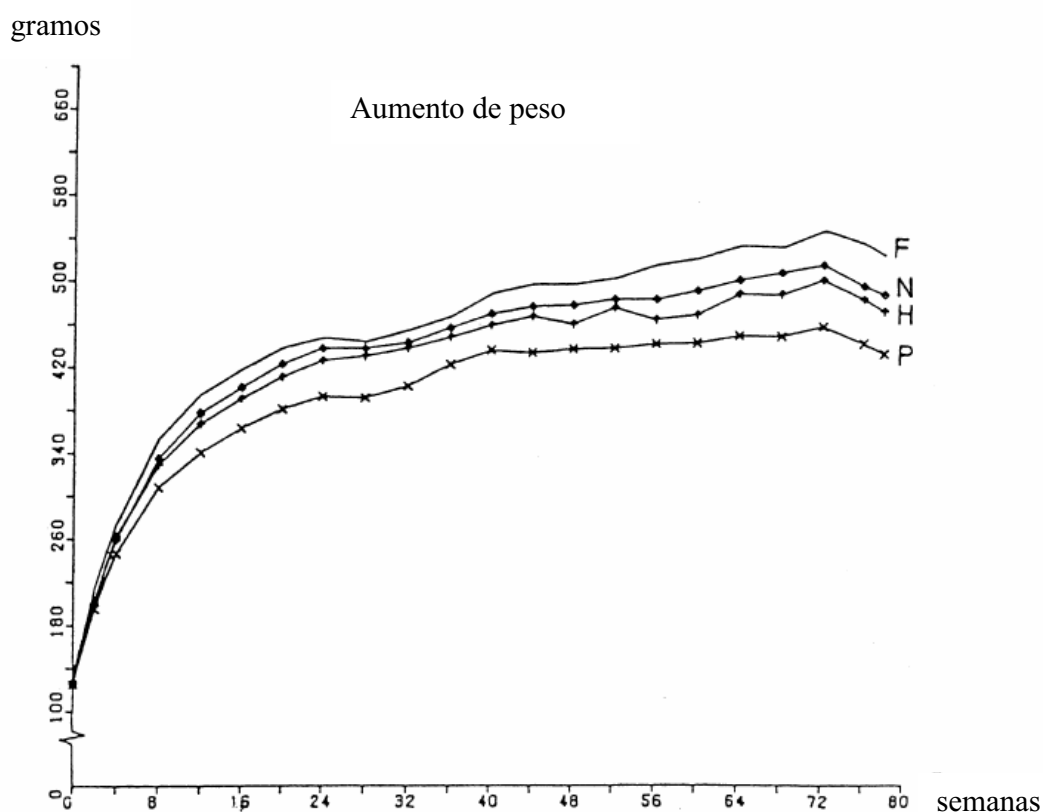


Figura 14. Ganancia de peso en animales machos después de la ingesta de aceite de girasol fresco F; aceite de girasol calentado (H); fracción no polar (N); fracción polar (P) (Billek y col., 1979).

A partir de este estudio, sus autores propusieron la utilización del porcentaje de compuestos polares como un índice de calidad de los aceites de fritura y establecieron que los aceites eran seguros hasta un 25% de compuestos polares.

A partir de todos estos estudios se puede concluir que los aceites de fritura no suelen presentar toxicidad crónica en animales de experimentación, incluso cuando se utilizan aceites con un elevado contenido en compuestos polares a dosis muy altas. Además, hay que tener en cuenta que estos estudios se encuentran un tanto alejados de la realidad puesto que las dietas que normalmente se utilizan para criar ratas de laboratorio tienen un contenido total de grasa que oscila entre el 3 y el 6%. Por otro lado, la mayoría de las normativas de los distintos países establecen un máximo para el contenido de compuestos polares del 25-27 % (Tabla 15, apartado II.7.2) y aunque estos valores no deberían sobrepasarse, en realidad algunos aceites de fritura tomados de restaurantes los sobrepasan ampliamente (Al-Kahtani, 1991; Andrikopoulos y col.,

2003; Dobarganes y Márquez-Ruiz, 1995, 1998). No obstante, este no es el caso de la fritura en continuo donde normalmente el contenido de compuestos polares queda muy alejado del límite de descarte puesto que la gran cantidad de producto que se fríe hace que el grado de renovación del aceite de la cuba de fritura sea muy alto.

A pesar que los aceites de fritura no parecen suponer un riesgo evidente para la salud, no hay que olvidar que algunos estudios han atribuido a los aceites oxidados o a su fracción polar efectos biológicos negativos (Sánchez-Muñiz y Cuesta, 1998; Billek y col., 1979) y que diversos de los componentes de esta fracción también presentan en mayor o menor grado efectos biológicos negativos claramente demostrados (Guardiola y col., 2002; Uchida, 2000; Schroepfer, 2000; Sebedio y Chardigny, 1996; Esterbauer y col., 1991).

En este sentido, se han descrito efectos biológicos negativos para muchos de los productos de oxidación lipídica. Entre ellos, destacan los derivados oxidados del colesterol (derivados con grupos hidroxilo, cetónicos y epóxido) y de los ácidos grasos (compuestos aldehídicos, monómeros cíclicos e hidroperóxidos).

En cuanto a los derivados oxidados del colesterol, que únicamente se encontrarán en el medio de fritura cuando se utilicen grasas de origen animal o se frían productos de este mismo origen, se han observado en multitud de trabajos diversos efectos biológicos, principalmente negativos (Tabla 9). Además, estos compuestos que se absorben a nivel intestinal, se han encontrado en diversos tejidos humanos (Tabla 10) e incluso se han relacionado mediante estudios epidemiológicos con la progresión de la lesión aterosclerótica (García-Cruset y col., 2002). En cambio, hasta este momento se han realizado pocos estudios sobre los efectos biológicos de los derivados oxidados de los fitosteroles (Guardiola, 2004).

Tabla 9. Principales efectos biológicos de los productos de oxidación del colesterol (Osada, 2002; García-Cruset y col., 2002).

Efectos Biológicos de los productos de oxidación del colesterol	Inhibición de la HMG-CoA reductasa
	Efectos sobre otros enzimas que participan en el metabolismo del colesterol
	Efectos sobre la estructura y funcionalidad de la membrana celular
	Citotoxicidad
	Efectos mutagénicos y carcinogénicos
	Efectos sobre el sistema inmunológico
	Efectos sobre la permeabilidad vascular
	Efectos sobre la síntesis de prostaglandinas, agregación plaquetaria y reactividad vascular
	Efectos sobre el número y función de los receptores LDL
	Inducción de la acumulación de ésteres de colesterol y de la formación de células espumosas

Tabla 10. Principales productos de oxidación del colesterol encontrados en muestras biológicas (Diczfalusy, 2002; García-Cruset y col., 2002).

Muestras biológicas	Productos de oxidación del colesterol
Plasma sanguíneo	7 α -HC, 7 β -HC, 7-KC, α -CE, β -CE, CT, (24S)-HC, 27-HC
Fracciones lipoproteicas	7 α -HC, 7 β -HC, 7-KC, α -CE, β -CE, (24S)-HC, 27-HC
Lipoproteínas oxidadas	7 α -HC, 7 β -HC, 7-KC,
Lesiones ateroscleróticas	7 β -HC, 27-HC
Hígado	7 α -HC, (24S)-HC, 27-HC
Cerebro	(24S)-HC
Otras muestras biológicas	Macrófagos: 7-KC, 27-HC Eritrocitos: 7 α -HC, 7 β -HC Glándulas suprarrenales: (24S)-HC Cataratas: 7 β -HC, 7-KC

7 α -HC, 7 α -hidroxicolesterol; 7 β -HC, 7 β -hidroxicolesterol; 7-KC, 7-cetocolesterol; α -CE, colesterol-5 α ,6 α -epóxido, β -CE, colesterol-5 β ,6 β -epóxido; CT, colestanol; (24S)-HC, (24S)-hidroxicolesterol; 27-HC, 27-hidroxicolesterol.

Diversos productos de oxidación de los ácidos grasos que se absorben a nivel intestinal también presentan efectos biológicos claramente definidos. En el caso

de los aldehídos se han descrito efectos biológicos negativos (básicamente, citotoxicidad, mutageneidad e inhibición de la síntesis de DNA, RNA y proteínas) principalmente para el malondialdehído y los 4-hidroxi-alquenos (Kuksis, 2000; Uchida, 2000; Kamal-Eldin y Appelqvist, 1996; Esterbauer y col., 1991). También se han descrito algunos efectos biológicos negativos (básicamente, alteración de la estructura y funcionalidad de la membrana celular y alteración del metabolismo lipídico en el hígado) para los monómeros cíclicos, familia compleja de compuestos que se forman a altas temperaturas esencialmente a partir de los ácidos linoleico y linolénico (Martin y col., 2000; Flickinger y col., 1997; Sebedio y Chardigny, 1996). Por otro lado, tenemos que se ha demostrado la toxicidad aguda de los hidroperóxidos de los ácidos mediante dosis intravenosas en animales de experimentación. Sin embargo, dosis orales equivalentes o superiores no tuvieron el mismo efecto, lo que evidencia que los hidroperóxidos son escasamente absorbidos. De hecho, gran parte de estos compuestos son reducidos por la glutatión peroxidasa intestinal y absorbidos en forma de los correspondientes alcoholes. Además, estos hidroperóxidos también pueden descomponerse en otros productos de oxidación secundaria con efectos biológicos negativos, como los compuestos aldehídicos, comentados anteriormente, y los de los epoxiácidos. No obstante, el grado de conocimiento sobre los efectos biológicos de los hidroxiácidos y epoxiácidos es bastante limitado, aunque se sabe que se absorben a escala intestinal (Spiteller, 1998). Sin embargo, no se debe olvidar que los hidroperóxidos de los ácidos grasos se pueden formar *in vivo* y que se les ha relacionado con diversas enfermedades degenerativas (Spiteller, 1998).

Por otro lado, hay que tener en cuenta que los aceites de fritura presentan un contenido en hidroperóxidos bajo debido a que estos compuestos son altamente inestables a las temperaturas de fritura y se descomponen rápidamente en productos de oxidación secundaria. Algunos de estos productos, como ya hemos comentado, presentan efectos biológicos negativos y se han encontrado en concentraciones apreciables en los alimentos fritos. Este es el caso de los derivados oxidados del colesterol y de los fitosteroles, de los aldehídos de bajo peso molecular y de los monómeros cíclicos (Seppanen y Csallany, 2002, 2004;

Dutta y Appelqvist, 1996 y 1997; Dutta, 1997; Sebedio y col., 1996; Zhang y col. 1991).

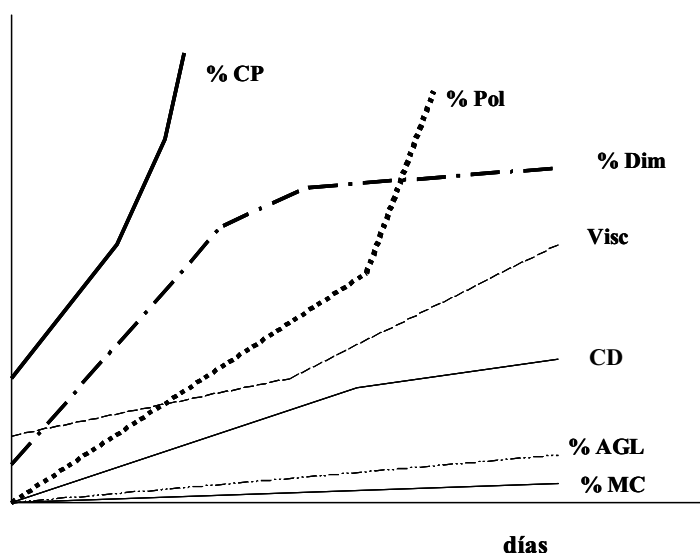
Por tanto, aunque a partir de los estudios de toxicidad crónica no parece que los aceites de fritura, con un contenido en compuestos polares inferior al 25-27%, supongan un riesgo evidente para la salud, hay que tener en cuenta las limitaciones que presenta la extrapolación de los resultados obtenidos con animales de experimentación a la especie humana. Además, la oxidación de la fracción lipídica de los alimentos no es un tema que se pueda menospreciar, puesto que una persona se encuentra expuesta, en mayor o menor grado, durante toda su vida a una serie de compuestos que presentan efectos biológicos negativos, lo cual crea una situación en la que es muy difícil evaluar el riesgo real que suponen las cantidades ingeridas de estos compuestos para la salud. De hecho, actualmente ni tan sólo se tienen estimaciones fiables sobre las cantidades ingeridas de los distintos compuestos de oxidación lipídica. Por último, hay que tener en cuenta que los alimentos fritos, producto de las reacciones que en ellos se producen durante la fritura, presentan otros compuestos con efectos biológicos negativos entre los que ha destacado recientemente la acrilamida (Becalski y col.; 2003; Amrein y col., 2003; Gertz y Klostermann, 2002, Biedermann y col., 2002).

II.6. CONTROL DE CALIDAD DE LOS ACEITES DE FRITURA Y DE LOS PRODUCTOS FRITOS

En respuesta a las observaciones de efectos potencialmente nocivos o tóxicos de los aceites de freiduría excesivamente reutilizados, los organismos internacionales y la administración han dictado recomendaciones y disposiciones legales, que regulan la utilización y vida máxima de los aceites y grasas sometidas a fritura (AOCS, 1999; DOCE, 1991; IUPAC 1987; AOAC, 1981).

En el apartado II.3 ya se han descrito las principales alteraciones que tienen lugar en los aceites sometidos a fritura y que tendrán repercusiones importantes en el cambio de propiedades físicas y composición química de los mismos. Los controles que se vayan a establecer en estos aceites estarán dirigidos a medir aquellas alteraciones que permiten evaluar de forma más fiable y simple la calidad del medio de fritura y del producto frito. Finalmente, en este trabajo, deben llegarse a proponer un número reducido de estos parámetros que sean de una mayor utilidad analítica en el control de rutina. El parámetro analítico contemplado más universalmente por la legislación, para desechar los aceites de fritura, es el porcentaje total de compuestos polares (% CP). Este parámetro intenta realizar una evaluación global de la alteración de los TG y AG, a través de la diferenciación entre % de compuestos apolares presentes en el aceite usado (cifra que corresponderá a los TG inalterados, mayoritariamente), y % de compuestos polares en el mismo, cifra que corresponderá a los componentes con ciertos grupos químicos polares, que son la mayor parte de componentes de alteración: AG libres, MG y DG, polímeros y compuestos oxidados. Debe seguirse un procedimiento de separación de ambas fracciones que esté normalizado, ya que la polaridad es un concepto relativo y, según la polaridad de los disolventes usados en la separación, puede obtenerse una fracción de compuestos polares variable.

Por otra parte, otras características químicas y físicas evolucionan también a medida que avanza la alteración en un aceite sometido a fritura, tal como muestra la Figura 15.



% CP= porcentaje de compuestos polares; % Pol= porcentaje de polímeros; % Dim= porcentaje de dímeros; Visc= viscosidad; CD= constante dieléctrica; % AGL= porcentaje de ácidos grasos libres; % MC= porcentaje de monómeros cíclicos.

Figura 15. Evolución de diferentes propiedades físicas y químicas en los aceites de fritura (Wu y Nawar, 1986).

Por esta razón, la determinación de los valores correspondientes a las propiedades físicas y químicas de los aceites sometidos a fritura, así como la mayoría de tests rápidos desarrollados para el control a pie de cuba de fritura, intentan hallar una correlación más o menos directa con el contenido de compuestos polares. Dentro de estas propiedades se hallan el índice de refracción, el color, la viscosidad, la constante dieléctrica, el índice de yodo, el índice de acidez, el índice de ATB o de p-anisidina y los compuestos carbonílicos totales. No obstante, sólo algunos tienen una aplicación rápida y sencilla y ofrecen buenas correlaciones con el % CP, para cualquier tipo de aceites y grasas. Por otra parte, no debemos olvidar la variabilidad del comportamiento de todos estos parámetros físicos y químicos en función del tipo de aceite utilizado (% AGPI, concentraciones de diferentes antioxidantes y prooxidantes presentes) y de las condiciones de fritura (tiempo, temperatura y tipo de freidora).

II.6.1. Parámetros analíticos para el control de la alteración en los aceites y productos fritos

Diversos estudios (Dobarganes y col., 2002; White, 1991; Löliger, 1989; Stevenson y col., 1984) realizan diferentes clasificaciones de los tipos de métodos

aplicables para el control de los aceites de fritura, que podrían agruparse de la forma siguiente:

- 1) Observación de propiedades físicas (sin requerimientos de laboratorio): ej. la observación de la evolución del color o de la formación de espuma, la aparición de aroma desagradable o un tiempo preestablecido máximo de fritura. Dichos métodos son los procedimientos más utilizados en el sector de las freidoras discontinuas y la eficacia de su aplicación depende de la experiencia y habilidad del usuario.
- 2) Medida de propiedades físicas con técnicas de laboratorio: ej. punto de humo, altura de espuma, viscosidad, índice de color (absorción en la zona del visible), índice de refracción, etc.
- 3) Medida de propiedades químicas con técnicas de laboratorio: ej. acidez libre, índice de ATB, índice de p-anisidina, carbonilos totales, AG insolubles en éter de petróleo, compuestos polares, etc.
- 4) Análisis sensorial de la grasa o aceite y del alimento frito.

Las medidas analíticas (2 y 3) son ampliamente utilizadas pero poseen inconvenientes como la necesidad de utilizar como referencia el valor del aceite inicial, la evaluación de un aspecto parcial de la compleja degradación producida durante la fritura o la evaluación de aspectos más dependientes de la composición del alimento que de la degradación del aceite (Stevenson y col., 1984).

Discutiremos a continuación los métodos de mayor utilidad y significación en el control de aceites de fritura y productos fritos, teniendo siempre en consideración todo aquello que hace referencia a la variabilidad del comportamiento de todos estos parámetros físicos y químicos, en función del tipo de aceite utilizado y de las condiciones de fritura. En este sentido, Fritsch y col. (1979) advierten que los ensayos experimentales llevados a cabo por calentamiento no pueden compararse estrictamente con la fritura auténtica. Algunos parámetros, como el % total de compuestos polares, la constante dieléctrica, el color o los dienos conjugados dan resultados comparables en diferentes condiciones de tratamiento, pero no los dan otros parámetros, como el índice de acidez. El efecto de la

composición del aceite sobre estos parámetros es de tipo general, aunque algunos de ellos parecen ser más uniformes en su respuesta, como son el % total de compuestos polares o el % de polímeros de TG.

II.6.2. Métodos para la determinación de la alteración hidrolítica

II.6.2.1. Índice de acidez

Existen diferentes procedimientos normalizados (AOCS Cd 3d-63, ISO 660:1996, UNE 55.011 y 55.063, AFNOR 60.221, IUPAC 2.201), que difieren únicamente en algunos detalles. La valoración debe realizarse siempre con una solución etanólica de hidróxido potásico (KOH), mientras que la materia grasa a valorar debe disolverse en un disolvente adecuado. Existen dos tipos de procedimientos propuestos, los que utilizan el etanol como disolvente y los que utilizan una mezcla de un alcohol con un disolvente orgánico como puede ser la mezcla etanol/éter etílico (50:50, v/v). La elección del disolvente parece tener pocas repercusiones en el resultado, pero éste depende de forma crítica de la naturaleza de la muestra, así como de una agitación continua y efectiva.

Generalmente, predominan los métodos que usan el etanol como disolvente único, sistema propuesto por Bishop y col. (1922), que estableció también los sistemas indicadores más adecuados. Estos métodos tienen la dificultad de que, aunque los AG libres son solubles en etanol, los TG no, lo que provoca un sistema bifásico que requiere muchas precauciones para una buena reproducibilidad y exactitud en la determinación, ya que la observación del punto final es compleja. Para la determinación del punto final es más recomendable utilizar un sistema potenciométrico, ya que la coloración propia de muchas materias grasas puede dar lugar a errores en la utilización de los indicadores visuales de coloración. En el caso de utilizar estos indicadores, el más recomendado es la fenolftaleína, aunque algunos autores sugieren que se obtienen puntos finales más exactos con la timolftaleína y el azul de timol. La Tabla 11 resume las características de diferentes procedimientos propuestos para la determinación de este índice.

Como ya hemos comentado antes, los procesos hidrolíticos afectan de forma importante a la grasa o aceite sometido a fritura. Por ello, la evaluación de la acidez libre es un parámetro que tiene una cierta significación. Aunque la evolución (incremento) de los valores del índice de acidez en las grasas de fritura presenta una clara influencia sobre otros índices, especialmente el punto de humo, no obstante, en la práctica no siempre presenta una elevada correlación con aquellos parámetros indicadores de la alteración global (% compuestos polares, constante dieléctrica). Cabe señalar que sólo se observa una correlación aceptable con los parámetros de oxidación para la fritura industrial en continuo con aceites controlados, dependiendo bastante de la acidez inicial del aceite, de las condiciones de fritura, del tipo de alimento frito, etc. Por estas razones, la normativa de algunos países recoge valores máximos de acidez libre para los aceites de fritura (ver apartado II.7.2.).

Tabla 11. Características de diferentes métodos para la determinación de la acidez libre (Mehlenbacher, 1977).

Método	Muestra	Peso (g)	Disolvente	Indicador
AOCS ¹	Todas las grasas, excepto aceites secantes	3,5-56,4	Etanol	Fenolftaleína
AOCS	Aceites secantes	1,0-20,0	Isopropanol-Tolueno (1:1)	Fenolftaleína
AOAC	Todas las grasas	7,05-56,4	Etanol	Fenolftaleína
NCPA	Aceites vírgenes vegetales	7,05	Etanol	Fenolftaleína
BSI-1	Todas las grasas, excepto las de BSI-2	2,0-50,0	Etanol-Benceno (2:1)	Fenolftaleína
BSI-2	Lanolina, aceites oxidados y polimerizados	2,0-50,0	Agua caliente	Timolftaleína o Azul alcalino 6B
IUPAC	Todas las grasas	5-10	Eter etílico-Etanol (1:1)	Fenolftaleína
Ames y Licata (1948)	Todas las grasas	10	Benceno-Isopropanol-Agua (50:49,5:0,5)	Fenolftaleína

¹ AOCS (*American Oil Chemistry Society*); AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*); NCPA (*National Cottonseed Products Association*), BSI (*British Standards Institution*), IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*).

II.6.3. Métodos físicos para la determinación de la alteración del aceite

Diversas técnicas instrumentales se han utilizado para medir alguna propiedad física de los aceites y grasas calentados que evolucione de forma paralela a la formación de compuestos de alteración y, especialmente, a los compuestos polares. Entre ellas destacan los siguientes:

II.6.3.1. Índice de refracción

Existen diferentes procedimientos normalizados para esta determinación física (IUPAC 2102, AFNOR 60212, AOAC 28.009, UNE 55.015, ISO 6320, AOCS Cc7-25). Sus valores aumentan al ir aumentando la alteración en el aceite de fritura, aumento que puede alcanzar hasta un 3-5%. No obstante, la nula selectividad y escasa sensibilidad de esta medida hace que su utilización no sea excesivamente interesante a estos efectos, ya que las variaciones debidas a la estructura de los triacilglicerolés y a su insaturación son mayores que las variaciones causadas por la alteración.

II.6.3.2. Índice de espuma

Como otras propiedades físicas, las propiedades de superficie de las grasas calentadas también varían respecto a la grasa original, debido a la presencia de polímeros. La formación de espuma en los aceites de fritura que no se disipa o dispersa es un indicador de que el aceite debe ser descartado. Este índice puede ser afectado por la solubilización de componentes del alimento frito que modifican las características de la grasa.

El fundamento del método cuantitativo es la calefacción del aceite a ensayar en un tubo graduado durante un cierto tiempo, y el registro del comportamiento de la espuma, que sube hasta un máximo, se estabiliza y luego desciende. Se anotan los volúmenes medio y máximo de espuma.

II.6.3.3. Constante dieléctrica

La alteración de la grasa por la fritura también produce un aumento significativo en su constante dieléctrica. Este es el fundamento de un sistema introducido en la práctica rutinaria, por su bajo coste, rapidez y buena correlación con el contenido en compuestos polares. Existen diversos aparatos comercializados, como el FOS (Food Oil Sensor), que resultan muy útiles para la medida a pie de cuba de fritura.

Esta ventaja de la sencillez de aplicación se une al hecho de la excelente correlación (0,991, según datos de Fritsch y col., 1979, en diferentes *shortenings*) que presenta con los valores del % total de compuestos polares, por lo que podría sustituir dicha determinación con garantías. Valores de 3,0 a 4,0 de la constante medida con el FOS (según la composición de la grasa) se corresponden a unos valores de 25-27% de compuestos polares (Croon y col., 1986; Fritsch y col., 1979). Diferentes autores han estudiado la correlación entre los valores de la constante dieléctrica y otros parámetros de alteración en grasas de fritura y calentadas y muestran una correlación significativa para diferentes tipos de aceites (aceite de soja refinado y sus mezclas con oleína de palma y aceite de sésamo; *shortenings* con un rango de AGI/AGS de 2,9-3,4, hidrogenados y no hidrogenados), así como en diferentes condiciones de temperatura y con o sin adición de antioxidantes (Perrin, 1992; Chu, 1991; Smith y col., 1986; Fritsch y col., 1979). Así, según datos de Fritsch y col. (1979), la correlación es excelente en *shortenings* calentados con la disminución del índice de yodo (0,947), pero no tan buena con el color (0,785), el índice de peróxidos (0,773) y el contenido de dienos conjugados (0,745), siendo menor la correlación con el Índice de acidez (0,569). Otros autores refieren que la correlación es excelente también, para el aceite de soja, entre la constante dieléctrica y los índices de refracción, de carbonilos y de p-anisidina. Resulta muy interesante el trabajo de Paradis y Nawar (1981a), que intenta dilucidar que tipo de componentes de alteración son los que más afectan al incremento del valor de la constante dieléctrica. Observaron que dicha constante refleja el equilibrio entre fracciones polar y no polar del aceite de fritura y, más concretamente, detectaron un efecto de aumento de dicha constante al aumentar la humedad, los dímeros oxidados, y los componentes volátiles oxidados (aldehídos), siendo menos significativo el efecto de los diacilgliceroles. Por el contrario, un efecto depresor de dicha constante fue hallado para los ácidos

grasos libres, los dehidrodímeros o los compuestos volátiles no oxigenados. Zhang y Addis (1990) utilizan este método junto con el valor de acidez como métodos para la predicción de los niveles de óxidos de colesterol en sebo calentado, obteniendo una elevada correlación ($r=0,94$; $p<0,01$).

II.6.3.4. Punto de humo

El punto de humo de un aceite o grasa desciende a lo largo del proceso de fritura, debido a la formación de AGL y otros compuestos de menor peso molecular que los TG. El seguimiento de los valores de este parámetro puede ser también un buen sistema para controlar el avance de la alteración global. Tiene la ventaja de ser una determinación sencilla y que no requiere instrumental específico (AOCS 9a-48). En contra tiene el hecho de su escasa sensibilidad y la notable variabilidad en su medida. En la práctica, sólo se encuentran excelentes correlaciones con el índice de acidez, siendo menores con parámetros de alteración global, como el % de compuestos polares.

II.6.3.5. Viscosidad

Como es lógico suponer, la formación de polímeros conduce a un incremento de la viscosidad del aceite o grasa a lo largo de la fritura. Por esta razón, numerosos autores han utilizado con éxito esta medida para evaluar la calidad de estos aceites y grasas. No existen aparatos específicos y, de hecho, puede utilizarse cualquier tipo de viscosímetro, como son los de tipo Ostwald (NF T 51032), los capilares de Ubbelohde/Cannon-Fenske (AFNOR 60-100), etc. No obstante, en la medida de la viscosidad deben tenerse siempre presentes los valores del aceite de partida y la necesidad de una temperatura definida a la cual realizar la medida ya que este parámetro afecta de manera inversamente proporcional a su resultado.

II.6.3.6. Color

El proceso de fritura comporta un oscurecimiento del color. Algunos autores, como Yaghmur y col. (2001) y Fritsch y col. (1979) utilizan la medida de la

absorción a 420 nm de una solución de la grasa en isooctano (1 mg/mL), como índice de evolución de la coloración durante la fritura. Se obtienen excelentes correlaciones de esta medida, en diferentes grasas y aceites con parámetros habitualmente utilizados, como puede ser el % total de compuestos polares, la constante dieléctrica o la disminución del índice de yodo.

Sin embargo, la determinación del color mediante un colorímetro Lovibond se encuentra más extendida, prueba de ello es la inclusión de la misma en métodos oficiales (AOCS Cc 13e-92 y Cc13a-43). Este colorímetro visual diseñado para potenciar al máximo el uso de filtros de vidrio, especialmente el rojo y el amarillo en el caso de aceites y grasas ha sido ampliamente utilizado para medir la alteración de aceites de fritura (Xu, 2003; Chu y Hsu 2001; Maes, 1997; Belbin 1993, 1994).

El oscurecimiento del color es un proceso complejo donde intervienen diferentes productos de descomposición, polimerización e hidrólisis además de compuestos minoritarios como los pigmentos del aceite e incluso los componentes del producto que se ha frito (Xu, 2003). Es por ello un método poco fiable para determinar la alteración de los aceites de fritura (Orthofer y Cooper, 1996a).

II.6.4. Métodos basados en la composición para la determinación de la alteración del aceite

II.6.4.1. Disminución del contenido en AGPI

La determinación de la composición en ácido grasos por cromatografía de gases es un método de práctica habitual en el laboratorio de análisis de lípidos y, en este caso, su aplicación puede resultar un índice de interés, centrándonos en los AGPI, que son especialmente afectados por la fritura. Así, en algunos casos se observan disminuciones superiores al 25% en AGPI, por lo que algunos autores (Miller y White, 1988) lo proponen como un índice muy sensible, especialmente para aceites con elevado contenido en AGPI. Los aceites cuando se someten a fritura, experimentan un cambio en el perfil de los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), ya que la introducción de moléculas de oxígeno en sus dobles enlaces puede conllevar la desaparición de AG insaturados. El descenso observado en el

contenido en ácido linoleico o linolénico de los aceites de fritura (los dos ácidos grasos poliinsaturados mayoritarios en los aceites comestibles) es debido a su destrucción por oxidación, polimerización, etc., y puede suponer un parámetro excelente para conocer la alteración global del aceite (Romero y col., 2000). Las pequeñas diferencias que pueden encontrarse entre aceites con diferente grado de alteración no serían significativas, si en este análisis se cometen errores experimentales (Pantzaris, 1998). Los resultados obtenidos en este mismo estudio muestran, sin embargo, que se observan valores muy similares para la reducción en porcentaje de ácidos linoleico y linolénico en oleína de palma y aceites de soja y oliva, mientras la reducción fue mucho mayor para el aceite de girasol.

La forma de expresión de la disminución del contenido de AGPI no es uniforme, algunos autores lo han expresado como la reducción en porcentaje de los ácidos linoleico y linolénico (Pantzaris, 1998; Miller y White, 1988) o reducción en porcentaje del total de ácidos grasos insaturados (Pantzaris, 1999), considerando el cambio absoluto respecto a un estado inicial. Sin embargo, otros autores expresan el cambio relativo en forma de cociente, ya sea mediante la relación de la suma de ácidos grasos saturados/ suma de ácidos grasos insaturados (Smith y col., 1986; Coll y Rueda, 1984) o las relaciones entre determinados ácidos grasos como el cociente entre los ácidos linoleico/palmitico ($C_{18:2n-6}/C_{16:0}$) (Augustin y col., 1987; Al-Kahtani, 1991) o bien mediante la relación de pérdida entre ciertos ácidos grasos (pérdida de $C_{18:2n-6}$ / pérdida $C_{18:1n-9}$) (Jorge y col., 1997). Este tipo de cociente, entre un ácido graso representante mayoritario de los ácidos grasos poliinsaturados respecto a uno de los mayoritarios entre los saturados, proporciona una idea sobre la evolución del perfil de AG y la disminución del contenido de AGPI.

Augustin y col. (1987) obtuvo unas elevadas correlaciones ($r=-0,99$; $p<0,001$) entre el cociente ($C_{18:2n-6}/C_{16:0}$) y el % CP o la constante dieléctrica en oleínas de palma refinadas, tanto calentadas como sometidas a fritura.

II.6.4.2. Índice de yodo

Se trata de un método químico relacionado con el grado de insaturación de las grasas o aceites, y es por ello que depende intrínsecamente de la composición en AGPI de los mismos. Está basado en una valoración volumétrica por retroceso, donde la etapa inicial consiste en una fijación de un reactivo halogenado adicionado en exceso (usualmente monocloruro de yodo o monobromuro de yodo) a los dobles enlaces de los ácidos grasos mono- y poliinsaturados. Posteriormente este exceso de halógeno se hace reaccionar con yoduro, formándose triyoduro que es valorado con una solución de concentración conocida de tiosulfato, utilizando el engrudo de almidón como indicador. Existen diferentes métodos para la determinación del índice de yodo (AOCS Cd 1-25, IUPAC 2.205, AOAC 920.158, 920.159, 993.20), entre ellos cabe destacar los métodos de Wijs y Hanus, y sus modificaciones. La principal diferencia entre ambos se encuentra en el reactivo halogenado, ya que el de Hanus utiliza un reactivo bromado y el de Wijs un reactivo clorado. El monobromuro de yodo se considera un reactivo muy tóxico por inhalación y además origina más problemas medioambientales. Además, el método de Hanus no define el peso de muestra, simplemente indica que una vez realizada la reacción deberá quedar sin absorber una cantidad de yodo igual, por lo menos, al 60%-70% de la cantidad total de yodo añadida, mientras el método de Wijs indica el peso de la muestra según el índice de yodo previsto (que ira íntimamente ligada a la naturaleza del aceite o grasa). Aunque las diferencias numéricas entre ambos métodos son escasas, la AOCS (*American Oil Chemists' Society*) recomienda el método de Wijs.

El método de Wijs ha sufrido ciertas modificaciones como la sustitución del tetracloruro de carbono por una mezcla de ciclohexano: ácido acético (1:1, v/v). Sin embargo, esta modificación puede originar resultados erróneos en aceites con valores de índice de yodo entre 100-120 y especialmente en aceites poliinsaturados de origen marino. Este hecho se puso de manifiesto en un estudio realizado por la IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) indicando la posible necesidad de requerir una mayor tiempo de reacción, entre 2-3 horas, en dichos aceites. El Reglamento 2568 de la Comisión Europea (DOCE, 1991) recoge en los métodos de análisis una simplificación, considerando para aquellas muestras con un índice de yodo inferior a 150, mantener los matraces en

la oscuridad durante 1 hora; para las muestras con un índice de yodo superior a 150, así como en el caso de productos polimerizados o considerablemente oxidados, mantener en la oscuridad durante 2 horas.

La AOCS, en su método Cd 1c-85 determina el valor del índice de yodo directamente a partir de la composición en ácidos grasos poniendo de manifiesto la estrecha relación con su composición. Mazza y Qi (1992) utilizan dicho método para evaluar aceites de colza sometidos a diferentes tratamientos.

$$II = (C_{16:1} \times 0,950) + (C_{18:1} \times 0,860) + (C_{18:2} \times 1.732) + (C_{18:3} \times 2.616) + \\ (C_{20:1} \times 0,785) + (C_{22:1} \times 0,723)$$

Cuando el valor del índice de yodo es determinado en materiales con elevado contenido de ácidos conjugados, el resultado no es una medida del total de insaturación, pero sería un valor empírico indicativo del grado de insaturación (AOCS, 1999).

Algunos estudios revelan una correlación negativa ($p < 0,001$) entre el índice de yodo y la constante dieléctrica, tanto en aceites de origen vegetal como en grasas animales sometidas a fritura o calentamiento (Fritsch y col., 1979). Augustin y col. (1987) observan una buena correlación de este índice y otros valores como el % CP, el cociente ácido linoleico/ácido palmítico o la constante dieléctrica, en oleína de palma refinada calentada o sometida a fritura.

II.6.5. Métodos para la determinación de la oxidación primaria

II.6.5.1. Hidroperóxidos lipídicos

Determinación del índice de peróxidos mediante métodos volumétricos

Estos métodos son los más universalmente utilizados para la medida del contenido total de peróxidos lipídicos (AOCS Cd 8-53 y Cd 8b-90, IUPAC 2501, AOAC 28.025-28.026, 965.33, UNE 55.023, DGF C-VI 6a, ISO 3960:1998). Su fundamento es la oxidación del ión yoduro a yodo, en medio ácido, por parte de los peróxidos lipídicos presentes en la grasa disuelta en cloroformo. El triyoduro formado se valora con una solución normalizada de tiosulfato sódico, con engrudo de almidón como indicador. Los resultados se expresan, habitualmente, en mEq

de oxígeno por Kg de grasa, ya que los peróxidos tienen estructuras variadas y no conocidas exactamente.

$$\text{mEq O}_2/\text{Kg grasa} = (\text{V mL tiosulfato}) \times (\text{N tiosulfato}) \times 1000/\text{peso de la grasa en g}$$

A pesar de su gran aplicación, es un método que presenta una serie de dificultades que pueden conducir a resultados poco exactos y escasamente reproducibles. La primera es la escasa solubilidad del yoduro en cloroformo, lo que hace necesaria una enérgica agitación antes de la valoración, para favorecer el contacto entre fase acuosa y orgánica. En relación con esta cuestión, el oxígeno en contacto con el yoduro se renueva de forma eficaz con la agitación, lo que puede provocar su oxidación, dando errores por exceso en la medida de los peróxidos. Otras fuentes de error son, la acción catalítica de la luz sobre la oxidación del yoduro, y la fijación de yodo por los dobles enlaces, en grasas muy insaturadas. Así mismo, la reacción de reducción del yoduro no es muy rápida, lo que puede provocar una imprecisión en la observación del punto final. Finalmente, la sensibilidad de la reacción no es muy grande (0,5 meq O₂/ Kg grasa). Todo ello, ha llevado a intentar introducir modificaciones que permitan hacer la medida más exacta y precisa: por ejemplo, la determinación potenciométrica del punto final, en lugar de la apreciación visual del color; o bien el desplazamiento del aire en el matraz de valoración, usando una corriente de nitrógeno. Finalmente, el peso de muestra debe forzarse para su determinación en grasas poco oxidadas (hasta 5 o más g), para obtener una respuesta suficiente. No obstante, todo ello hace que el método resulte, en general, poco sensible e impreciso y que los resultados dependan, tanto de la naturaleza de la muestra, como del técnico analista y de sus hábitos de procedimiento.

La correcta práctica de este índice, no obstante, resulta una excelente herramienta para valorar el estado oxidativo inicial de grasas y aceites y sus resultados presentan, en general, una excelente correlación con otros sistemas de medida como la extinción específica a 232 nm (0,993), la determinación del oxígeno por CG-espacio en cabeza (0,87) o incluso con el análisis sensorial (0,84-0,97, según la grasa) (Hahm y Min, 1995).

Otros métodos para la determinación de peróxidos

La aplicación del índice de peróxidos a aceites de fritura se revela de escasa significación, ya que a la temperatura de fritura se destruyen estos compuestos termolábiles (Fritsch, 1981; Stevenson y col., 1984; Masson y col., 1997). Por otra parte, este índice puede resultar de interés en productos fritos, en los cuales puede dispararse la formación de peróxidos a partir del momento de su elaboración y hasta el momento de su consumo, dependiendo de las condiciones y tiempo de conservación (Fritsch, 1994).

Los problemas que presenta el método volumétrico, de sensibilidad y selectividad principalmente, han conducido a ensayar la determinación de los peróxidos lipídicos, en ciertos tipos de muestras, por métodos alternativos (Dobarganes y Velasco, 2002). Algunas alternativas, a pesar de su elevada fiabilidad, son excesivamente complejas para su adaptación al control de rutina de la oxidación, como es el caso de la CG (van Kujik y col., 1990), de la CLAE (Yamamoto y col., 1990; Yang, 1992), de la resonancia de spin de electrón (Yang y col., 1991) o de la resonancia magnética nuclear (Frankel y col., 1990). Más utilidad práctica para el control de rutina parece presentar la determinación de peróxidos por FTIR (van de Voort y col., 1994).

No obstante, por su sencillez y menor coste, los métodos alternativos que presentan un mayor interés son los colorimétricos, especialmente los basados en la oxidación del hierro por los peróxidos y la formación posterior de un complejo coloreado con el Fe^{3+} (Gay y col., 1999).

Entre ellos cabe destacar la determinación de peróxidos mediante el método del naranja de xilenol o método FOX (*Ferrous oxidation xylene orange*). Es una determinación en medio ácido, basada en una oxidación del Fe^{2+} a Fe^{3+} por reacción con los peróxidos lipídicos y posteriormente la formación de un complejo (Fe^{3+} -naranja de xilenol), que origina un color púrpura y que presenta un máximo de absorbancia entre 560-590 nm. Aunque su estequiometría no es exactamente conocida, algunos autores indican que 3 moles del complejo [Fe^{3+} -NX] son formados a partir de un mol de peróxido (Hermes-Lima y col., 1995).

La sensibilidad de este método es igual o mejor que la del ensayo colorimétrico con ioduro (Jiang y col., 1992; Nourooz-Zadeh y col., 1995) o la del método de la IDF (Burat y Bozkurt, 1996). Su elevada sensibilidad permite la determinación de peróxidos por debajo 1 $\mu\text{mol/Kg}$ en plasma (Nourooz-Zadeh y col., 1994) y de 1 mmol/Kg en aceites comestibles o en la fracción lipídica de diversos alimentos (Grau y col., 2000c; Nourooz-Zadeh y col., 1995). Respecto a la selectividad de la reacción cabe destacar que los acil y alquilperóxidos, así como el peróxido de hidrógeno presentan similar reactividad, mientras los endoperóxidos son escasamente reactivos.

Las concentración de dichos peróxidos se expresa en mmol de hidroperóxido de cumeno/ Kg de fracción lipídica mediante la extrapolación de las absorbancias a una recta de calibrado realizada con concentraciones conocidas de hidroperóxido de cumeno (CHP). Diversos autores (Grau y col., 2000c; Nourooz-Zadeh y col., 1995; Tres y col., 2002; Eymard y Genot, 2003) aplican este método a diferentes alimentos (carne de pollo, aceites vegetales, fracción lipídica de patatas y productos de aperitivo fritos, o filetes de pescado, respectivamente).

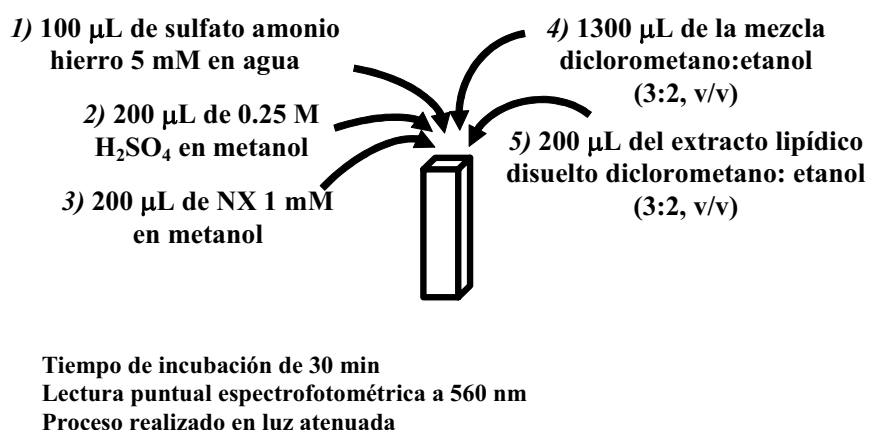


Figura 16. Determinación de peróxidos mediante el método del naranja de xilenol en aceites (Tres y col., 2002).

II.6.5.2. Absorción de la fracción lipídica a 232 nm

En los primeros estadios de la oxidación se produce una reordenación de los dobles enlaces de los AGPI que da lugar a la formación de dienos conjugados

(Figura 17), término que se refiere a una estructura con dos dobles enlaces carbono-carbono separados por un enlace simple carbono-carbono (-CH=CH-CH=CH-). Los dienos conjugados no se encuentran normalmente en los ácidos grasos, y por tanto, su presencia es indicativa de un proceso oxidativo normalmente mediado por compuesto intermedio reactivo y que en presencia de oxígeno dan lugar a la formación de HPL, que conservan todavía la conjugación (Moore y Roberts, 1998). Aunque esta determinación se relaciona íntimamente con los HPL, no debe olvidarse que determinados compuestos secundarios de oxidación, procedentes de la destrucción de los peróxidos, pueden también tener estructuras con dos dobles conjugados como aldehídos y cetonas α,β -etilénicas (Galanos y col., 1968).

Los dienos conjugados se pueden detectar por espectrofotometría pues tienen una absorción característica a 230-235 nm (Paz-Antolín y Molero-Meneses, 2000; Frankel, 1998; White, 1995).

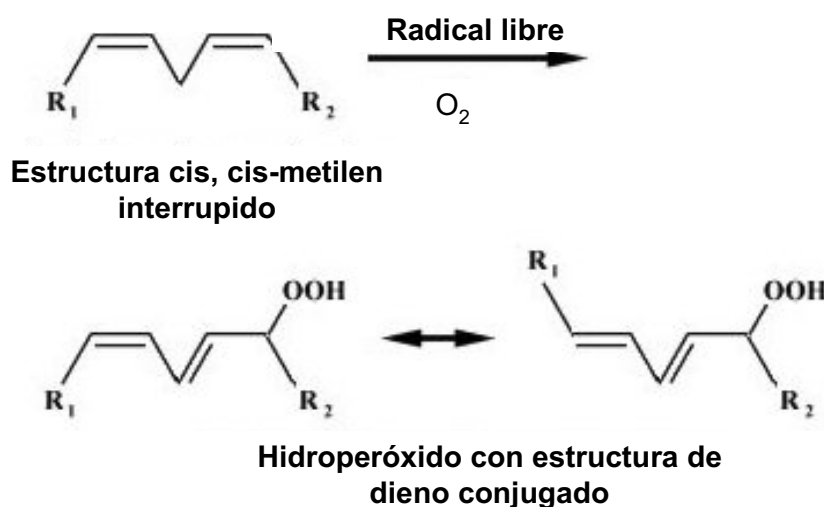


Figura 17. Proceso de formación de dienos conjugados del ácido linoleico (Min, 1998; Corongiu y Banni, 1994)

No obstante, deberá tenerse en cuenta siempre que el grado de insaturación de la grasa hará variar la proporción de dienos conjugados con relación al peso de grasa y, por tanto, los valores no serán estrictamente comparables entre diferentes tipos de grasa (Grau y col. 2000b; Frankel y col., 1996a; White, 1995). Respetando estas limitaciones, y con una adecuada utilización en cada caso, la medida del contenido de dienos conjugados por espectrofotometría UV se

muestra una técnica de gran interés, simple y reproducible, y con escasos requerimientos metodológicos y de habilidad del operador. La utilidad de este método ha sido demostrada por muchos autores, tanto en muestras de aceites y grasas comestibles (Paz-Antolín y Molero-Meneses, 2000; Corongiu y Banni, 1994; Pallota, 1994) como en muestras biológicas (Jialal y Devaraj, 1996; Puhl y col., 1994).

Los métodos oficiales (IUPAC 2.505, AOCS Ti 1a64, AOAC 28.048-28.054, DOCE, 1991) recogen la espectrofotometría directa, sin embargo, la lectura de la absorbancia, se ve interferida por algunos componentes que presentan una cierta absorbancia, en la zona cercana a 232 nm, como es el caso de los propios AGPI no oxidados. Por ello, algunos autores han propuesto la utilización de la segunda derivada del espectro, para obtener una lectura más selectiva. Esta utilización de la segunda derivada se discute ampliamente en el trabajo de Corongiu y Banni (1994), aunque algunos autores (Grau y col., 2000b) demuestran que para ciertos tipos de muestras no se consiguen mejoras significativas de la selectividad ni con la segunda ni con la tercera derivada.

La lectura espectrofotométrica se realiza por disolución de una cantidad variable de la grasa (según el grado de oxidación esperado), aunque otros procedimientos recomiendan trabajar a concentración constante de 0,05 g de grasa por 100 mL y diluir posteriormente, si es necesario, para obtener lecturas comprendidas entre 0,1 y 0,8 unidades de absorbancia (DOCE, 1991). Se han propuesto diferentes métodos para realizar esta medida, que se diferencian en el tipo de disolvente a utilizar: metanol (recomendable para los ésteres de AG); o bien isooctano, hexano o ciclohexano (para los TG o grasas). Los resultados se expresan usualmente como extinción específica a 232 nm (K_{232}) como en el método de la CEE (1) o % de dienos conjugados como en el método AOCS (2).

$$K_{\lambda} = E_{1\text{cm } \lambda}^{1\%} = A_{\lambda} / ce \quad (1)$$

$E_{1\text{cm } \lambda}^{1\%}$ = extinción específica a la longitud de onda λ .

A_{λ} = absorbancia leída en el espectrofotómetro a la longitud de onda λ .

c = concentración grasa de la disolución en g/100 mL.

e = espesor en cm de la cubeta.

$$\% \text{ DC} = 0,84 [(A / C) - K_o] \quad (2)$$

A es la medida de la absorbancia de la disolución de la grasa a 232 nm,

C es la concentración de la solución preparada,

Ko es la absortividad correspondiente al enlace éster (0,07) o ácido (0,03).

En ambos casos se trata de métodos normalizados que presentan una excelente precisión, si se llevan a cabo adecuadamente. Según un estudio de intercomparación desarrollado entre 22 laboratorios (AOCS, 1999) la variabilidad del método es <0,39% para el mismo operador e instrumento y <1,26% entre operadores e instrumentos diferentes.

Aunque la formación de dienos conjugados mediante la reordenación de los dobles enlaces es típica del proceso de autooxidación, se ve acentuada en procesos de calentamiento como la fritura. Por ello, la determinación de dienos conjugados puede ser utilizada para medir los cambios sufridos por los aceites a temperaturas de fritura, ya que durante la fritura la absorbancia del aceite a 232 nm incrementa, hasta llegar a un *plateau* (White, 1991; Orthofer y Cooper, 1996b). No obstante, distintos peróxidos que absorben a 232 nm son inestables considerándose que no puede usarse como una medida de la evolución de la oxidación a elevadas temperaturas. Por todo ello, la curva de evolución de la absorbancia a 232 nm, en función del tiempo, es compleja de interpretar, especialmente en aceites y grasas sometidas a fritura, en las que la destrucción de peróxidos está fuertemente catalizada.

Algunos autores (Masson y col., 1997; Al-Kahtani, 1991; Fritsch y col., 1979) demuestran que existe una buena correlación entre la absorción al ultravioleta a 232 nm y la constante dieléctrica o el % total de compuestos polares, incluso en medios de fritura fundamentalmente monoinsaturados. Otros autores (Chang y col., 2003; Önal y Ergin, 2002; White, 1995) han discutido la aplicación de los valores de absorbancia a 232 y 270 nm para la evaluación de la alteración en grasas de fritura, así como para el seguimiento de la estabilidad de productos fritos, y han observado que es un índice que puede tener utilidad, aunque su correlación con otros índices es compleja, dependiendo de la composición en ácidos grasos, uso de antioxidantes, etc.

II.6.6. Métodos espectrofotométricos para la determinación de la oxidación secundaria

II.6.6.1. Absorción de la fracción lipídica a 270 nm y 280 nm

Mientras los compuestos de oxidación primaria, formados durante la oxidación del aceite, absorben básicamente a 232 nm, los compuestos de oxidación secundaria (aldehídos, cetonas y ácidos) absorben a 268-270 y 280nm. La mayoría de estos compuestos secundarios provienen de la descomposición de los HPL y son preferentemente dicetonas etilénicas, alcadienales o cetodienos conjugados (White, 1995; Galanos y col., 1965). Por otro lado, los trienos conjugados formados durante el refinado del aceite, también absorben a 270 nm (Paz-Antolin y Molero-Meneses, 2000). Por tanto, para conocer la extensión de la oxidación de un aceite refinado sometido a fritura, se debe de conocer la absorción inicial al UV para poder considerar el incremento debido a la oxidación a elevadas temperaturas.

Aplicando un tratamiento con microondas a diferentes aceites y grasas vegetales, Yoshida y col. (1990), sólo encontraron diferencias entre aceites para la absorbancia a 268 nm, después de 8 min. Estos incrementos de absorbancia sólo se observaron para los aceites más poliinsaturados, mientras que la medida no presentó suficiente sensibilidad para los demás aceites típicamente monoinsaturados (aceite de oliva) y saturados (aceite de palma). Dichas diferencias, así como las presentadas por los mismos aceites a 232 nm estaban en relación directa con el contenido inicial en AGPI, en general, y de ácido linolénico en particular. Noor y Agustín (1984) observaron un comportamiento similar en la evaluación de la conservación de *banana chips*, en condiciones forzadas (65 °C, 50 días), para las cuáles se observó un perfil de curva de tipo claramente diferente para la absorción a 270 nm del obtenido para la absorción a 232 nm o para el IP, que seguían patrones muy similares de comportamiento entre sí. No obstante, los tres parámetros permitían evaluar de forma similar el comportamiento de diferentes antioxidantes adicionados para proteger el producto frente a la oxidación. En cambio, Che Man y Tan (1999) y Önal y Ergin (2002) encontraron un comportamiento paralelo entre los cocientes de extinción

específica a 232 nm y 270 nm en oleínas sometidas a fritura, lo cual indica que el comportamiento depende entre otros factores, de la composición del aceite o grasa y de las condiciones de oxidación.

Coll y Rueda (1984) comparan la absorción en la fracción lipídica extraída de las patatas fritas respecto al medio de fritura, observando valores inferiores en todos los casos.

II.6.6.2. Índice de carbonilos

El índice de carbonilos se puede realizar por diferentes métodos normalizados (JOCS 2.4.22-73, ISO 1271:1983). Los compuestos carbonílicos son, con diferencia, los compuestos mayoritarios derivados de la degradación secundaria de los hidroperóxidos de los ácidos grasos. Por ello, los métodos principales de evaluación de la oxidación secundaria en aceites y grasas están basados en reacciones que, más o menos selectivamente, detectan compuestos carbonílicos. No obstante, la diversidad existente entre los posibles compuestos carbonílicos formados en la oxidación de las grasas es, a su vez, también muy grande, lo que puede dificultar una determinación conjunta de diversas especies químicas. Así, existen compuestos carbonílicos volátiles, no volátiles y un tercer grupo combinados o ligados (ej. aldehidoglicéridos). Su naturaleza está relacionada también con propiedades diferentes. Así, los volátiles son responsables de la alteración del aroma y flavor (rancidez) de las grasas oxidadas, mientras que los no volátiles y ligados no. Por ello, la correlación de su concentración con otros parámetros sensoriales o químicos no siempre es buena.

La primera determinación de interés dentro de este grupo será la de los compuestos carbonílicos totales o índice de carbonilos (IC), que intenta una valoración global de los mismos en la grasa oxidada. El método clásico fue propuesto por Henick y col. (1954), pero es aún el más utilizado en la actualidad y consiste en la reacción de los compuestos carbonílicos con la 2,4-dinitrofenilhidrazina/ácido tricloroacético, con lectura de la intensidad de coloración de los derivados hidrazona formados. El punto crítico de la determinación es el hecho que la estructura del derivado formado dependerá del compuesto carbonílico, obteniéndose así una mezcla de productos, cuyo máximo

de absorción varía entre 430 y 460 nm. Por esta razón, la longitud de onda de la lectura será variable en función del tipo de grasa o aceite y de su composición en AG, fundamentalmente, ya que ello condiciona el tipo de derivados carbonílicos formados durante la oxidación. El resultado suele expresarse en μg de hexanal/Kg de grasa, ya que este aldehído es el mayoritario entre los compuestos secundarios de oxidación que aparecen en la mayor parte de grasas (White, 1995).

El método no está exento de interferencias o errores, tanto debidos a la propia metodología, como a la formación de carbonilos como artefactos, a partir de hidroperóxidos, durante la aplicación del procedimiento analítico, siendo especialmente negativa la calefacción. Por ello, algunos autores han sugerido algunos procedimientos para evitar este problema. El procedimiento más efectivo es la reducción previa de los hidroperóxidos presentes en el aceite, por reacción con dicloruro de estaño o trifenilfosfina (Chiba y col., 1989). Otra precaución que puede tomarse es el desarrollo del proceso a bajas temperaturas ($5\text{ }^{\circ}\text{C}$), aunque ello condiciona la velocidad de la reacción.

Diversos estudios han mostrado una buena correlación de los valores de este parámetro con los correspondientes a otros métodos de evaluación de la oxidación, como es el índice de p-anisidina, aunque no tan buena con otros índices como el % DC, en diferentes muestras de aceites sometidos a calefacción y fritura, para evaluar el transcurso de su oxidación (White, 1995; Yoshida y col., 1990). A pesar de su aparente sencillez, es un método que requiere excesivas precauciones para presentar una exactitud y precisión aceptables. Esta razón, además de su escasa correlación con otras medidas químicas y sensoriales en grasas oxidadas, hace que no sea un método muy apreciado para la evaluación de la oxidación secundaria.

II.6.6.3. Índice de p-anisidina

Una alternativa al método anterior es el índice de p-anisidina (IUPAC 2.504, AOCS Cd 18-90, ISO 6885:1998). Su fundamento es la formación de una base de Schiff de color amarillento, entre este reactivo y el grupo carbonilo de diversos compuestos presentes en el aceite o grasa (Figura 18). No obstante, no está

exactamente establecido el tipo de compuesto carbonílico que da preferentemente esta reacción, aunque algunos autores postulan que los 2-alquenes y los 2,4-alcadienos son los principales responsables de la misma, debido a que la disposición de dobles enlaces conjugados en estos aldehídos aumenta la intensidad de la absorción. De cualquier modo, como la abundancia de estos compuestos, así como de otros compuestos carbonilos depende de la composición en AG, la intensidad de la reacción dependerá sobre todo de la naturaleza de la grasa, a parte del grado de oxidación. Así, las grasas monoinsaturadas darán menor respuesta que las ricas en ácido linoleico y éstas menor respuesta que las ricas en ácido linolénico.

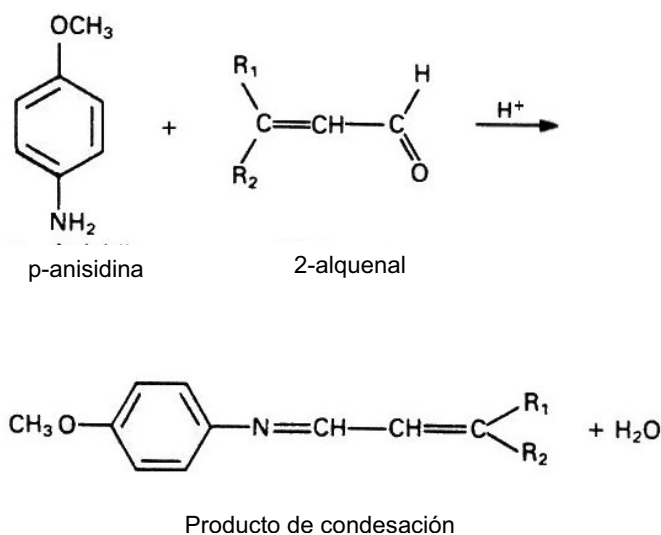


Figura 18. Formación de productos de condensación en la aplicación del índice de p-anisidina (Robards, 1988).

Este método es mucho más utilizado que el anterior (formación de fenilhidrazonas), ya que presenta la ventaja que sus condiciones son mucho menos agresivas, pues no necesita temperaturas elevadas, ni una fuerte acidez. De esta forma se minimiza el problema de la degradación de los peróxidos a compuestos carbonílicos durante la aplicación del método. El procedimiento es muy simple y consiste en disolver la muestra en isooctano o n-hexano (entre 0,5 y 4.0 g de grasa/ 25 mL, según grado de oxidación) y realizar una lectura a 350 nm. Añadir luego la solución de p-anisidina (0,25% p/v en ácido acético glacial) a una alícuota de la solución anterior y, después de 10 min exactos, leer la absorbancia

a 350 nm. El índice de p-anisidina (IAN) se calcula a partir de estas dos absorbancias según la siguiente fórmula,

$$\text{IAN} = 25 (1.2 A_R - A_0) / p$$

donde A_R = absorbancia después de añadir el reactivo; A_0 = absorbancia inicial de la solución grasa; y p = peso de grasa en gramos.

Son numerosos los analistas que han trabajado y trabajan con el IAN para evaluar la oxidación secundaria y los resultados de ensayos de intercomparación (White, 1995) confirman que presenta una buena reproducibilidad, con unos niveles de precisión excelentes, tanto intralaboratorio como interlaboratorio. Otros autores (List y col., 1974) encontraron desviaciones estándar inferiores a 0,1 unidades del IAN, como media en diversos tipos de aceites.

Holm (1972) propuso una fórmula de cálculo, a partir del IAN de una grasa, combinándolo con el valor de IP, para expresar de forma global la oxidación de la misma (primaria + secundaria). Es lo que se denomina índice Totox o índice de oxidación total (OV), cuyo cálculo se efectúa de la siguiente manera:

$$\text{Totox} = \text{IAN} + (2 \cdot \text{IP})$$

Algunos autores (Idris y col., 1992; List y col., 1974) han demostrado que se encuentran buenas correlaciones entre la evaluación sensorial y el IAN o el OV, para la medida de la oxidación en aceites frescos. También se han hallado buenas correlaciones entre el OV y el hexanal determinado por CG-espacio en cabeza, en aceites de semillas oxidados (Tompkins y Perkins, 1999). Así mismo, el IAN presenta correlación con el IC, la absorción a 270 nm y, menos claramente, con el IP. Por el contrario, no ofrece buena correlación con el contenido de DC (Noor y Agustin, 1984). A pesar de sus excelentes aplicaciones, algunos trabajos (Jacobsen, 1999; Schnepf y col., 1991) señalan que el IAN presenta escasa sensibilidad para detectar la oxidación en determinados tipos de grasas y aceites (p. ej. aceites de pescado). Como resumen, podemos decir que el IAN es un índice que goza de gran aceptación por su extrema sencillez y por dar una buena idea general de la oxidación secundaria, aunque de forma variable según la grasa contemplada. Más difícil parece su uso para predecir la rancidez desde un punto de vista sensorial. Finalmente, es interesante citar el estudio de Grompone

(1991), que señala como el IAn es un buen parámetro para medir la calidad y estabilidad de grasas refinadas, ya que la mayoría de operaciones implicadas en la refinación disminuyen sensiblemente el IP, mientras que el índice de p-anisidina se ve poco afectado.

Los índices habituales de medida de la oxidación secundaria también pueden encontrar aplicación en la evaluación del grado de alteración de los aceites de fritura. Chu (1991) estudia su aplicación a aceites de soja, sin mezclar o mezclados con oleína de palma y aceite de sésamo, y encuentra que existen excelentes correlaciones entre los índices de carbonilos y de p-anisidina con el resto de parámetros habitualmente usados en la evaluación del proceso de fritura, especialmente % compuestos polares, constante dieléctrica y el Fritest, así como con la disminución del índice de yodo. Valores de estos índices que corresponderían al punto cercano al rechazo del aceite de fritura reutilizado (% CP=22 y constante dieléctrica=4), serían de índice de carbonilos=42,2 e IAn=154,6, como valores medios para los aceites antes mencionados, a diferentes condiciones de fritura. El índice de p-anisidina parece también de utilidad en la evaluación de productos fritos y su estabilidad durante la conservación (White, 1995), si bien su correlación con el IP o el % dienos conjugados es pobre. Mejores correlaciones parece presentar en estos productos con la medida de la absorción a 270 nm.

La importante relación de muchos compuestos secundarios de oxidación como responsables de características de flavor y aroma, ha llevado a algunos autores a buscar determinaciones químicas que puedan establecer una relación entre alteración global del aceite y su calidad sensorial. Así, p. ej., Thompkins y Perkins (1999) han evaluado la correlación existente entre el índice de p-anisidina, los compuestos volátiles determinados por CG en espacio cabeza, el contenido de polímeros de los TG y una evaluación sensorial. Teniendo en cuenta que se realizó con un único tipo de grasa (aceite de soja hidrogenado), los autores encontraron una excelente correlación de este índice químico con la evaluación sensorial del olor del aceite (0,81), aunque menor con diferentes descriptores del aroma del producto frito. La correlación también fue buena (0,84) entre el índice de p-anisidina y el porcentaje de polímeros de los TG. En cuanto al análisis de los componentes volátiles, el índice de p-anisidina dió excelentes correlaciones (entre

0,66 y 0,92) con los contenidos de hexanal, heptanal, t-2-hexenal, t-2-heptenal, t-2-octenal y t,t-2,4-decadienal.

II.6.6.4. Índice del ácido tiobarbitúrico (ATB)

Esta prueba es quizás la más utilizada para la evaluación de la oxidación lipídica en productos cárnicos y tejidos biológicos. El método se basa en la reacción del malondialdehído (MDA) con dos moléculas de ácido tiobarbitúrico en medio ácido, para dar un derivado que presenta coloración rosada (máximo de absorción entre 530-535 nm).

No obstante, la reacción no es totalmente específica y existe aun hoy una gran controversia sobre qué tipo de compuestos participan, además del malondialdehído. Esto ha llevado a que el índice sea más conocido en la actualidad como índice de TBARS, es decir, de sustancias reactivas frente al ATB. Varios factores hacen que la reacción se comporte de forma variable según el sustrato y que sean muy numerosos los trabajos que recoge la bibliografía que discuten las condiciones idóneas de aplicación para cada muestra (Esterbauer y col., 1991; Hoyland y Taylor, 1991). Entre estos factores hay que considerar la composición en ácidos grasos de la muestra, la acidez del medio, la presencia de Fe u otros metales catalizadores de la oxidación, la presencia de antioxidantes. El malondialdehído se forma preferentemente en grasas que contienen AG con elevado número de dobles enlaces, mientras que su proporción frente al resto de compuestos de oxidación es baja para grasas ricas en ácido oleico. En este sentido, Esterbauer y col., (1991) observaron que la formación de malondialdehído, expresada en % de moles, a partir de diferentes ácidos grasos en presencia del sistema prooxidante hierro/ácido ascórbico era: oleico (0%), linoleico (0,5%), linolénico (4,5%), araquidónico (4,7%) y docosohexaenoico (7,6%). Además, Frankel (1998) ofrece una completa información del grado de formación del malondialdehído, a partir de diferentes ácidos grasos y sus derivados de oxidación primaria.

Las principales interferencias que dificultan la interpretación de los resultados de la determinación del índice ATB en diversos alimentos o tejidos son la reactividad del ATB con alcanales, 2-alquenes, 2,4-decadienes, dando productos con

máximos de absorción a 450 y 432 nm; compuestos carbonílicos procedentes de reacciones de pardeamiento y de la degradación de azúcares y proteínas; o las interferencias en la reacción por parte de aminoácidos, proteínas y productos derivados (Hoyland y Taylor, 1991; Guillén y Guzmán, 1988).

Existen, como ya se ha mencionado, múltiples protocolos propuestos para la práctica del índice del ATB. Estos procedimientos pueden clasificarse en cuatro tipos: los que proceden por extracción acuosa de la muestra en medio ácido y reacción con el ATB; los que proceden sobre la fracción lipídica previamente extraída; los que separan el MDA por destilación y luego desarrollan la misma reacción; y los que desarrollan la reacción sobre la muestra entera. También existen procedimientos que determinan el aducto ATB-MDA por CLAE y, así mismo, existen autores que determinan directamente el MDA por CG, sin necesidad de reacción con el ATB. Los métodos que han adquirido más aceptación son los del primer grupo, por su sencillez, bajo coste y relativa rapidez, mientras que la destilación implica mayores riesgos de inducir la oxidación y los métodos cromatográficos no están libres totalmente de interferencias, no son mucho más sensibles, y sobre todo son más costosos y complejos (Ulu, 2004; Fernández y col., 1997; Raharjo y Sofos, 1993).

Aunque el origen de la aplicación de esta reacción se remonta a 1948 (Bernheim y col.), para determinar el índice pueden citarse los métodos clásicos de Tarladgis y col. (1960 y 1964), Melton (1983), de Igene y col. (1985), y el normalizado recomendado por la AOCS (Cd19-90). Debido a los problemas generales que presenta la reacción del ATB, relativos sobre todo a la selectividad, Botsoglou y col. (1994) han propuesto medir el aducto formado a partir de la lectura en la tercera derivada del espectro de absorción, en un intento de obtener una metodología más fiable y menos sujeta a interferencias.

El método de Botsoglou (1994), que trabaja con el extracto acuoso ácido de la muestra, consiste en tratar la muestra (2 g) con solución acuosa de ácido tricloroacético (5% p/v) y solución de BHT (0,8% p/v) en hexano, y homogeneizar con un homogeneizador de alta velocidad. Se centrifuga y se descarta la fase hexánica. Se filtra la fase acuosa y se toma una alícuota de la misma que se somete a reacción con la solución de ATB (0,8% p/v), durante 30 min a 70 °C.

Posteriormente se enfría la solución y se lee en el espectrofotómetro, frente a un blanco constituido por la mezcla de reactivos, y se calculan los μg de MDA a partir de una recta de calibrado realizada con soluciones patrón. Se utiliza normalmente como patrón el 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP), como tetraetoxiacetal del malondialdehído, que origina MDA cuando se trata en caliente en medio ácido.

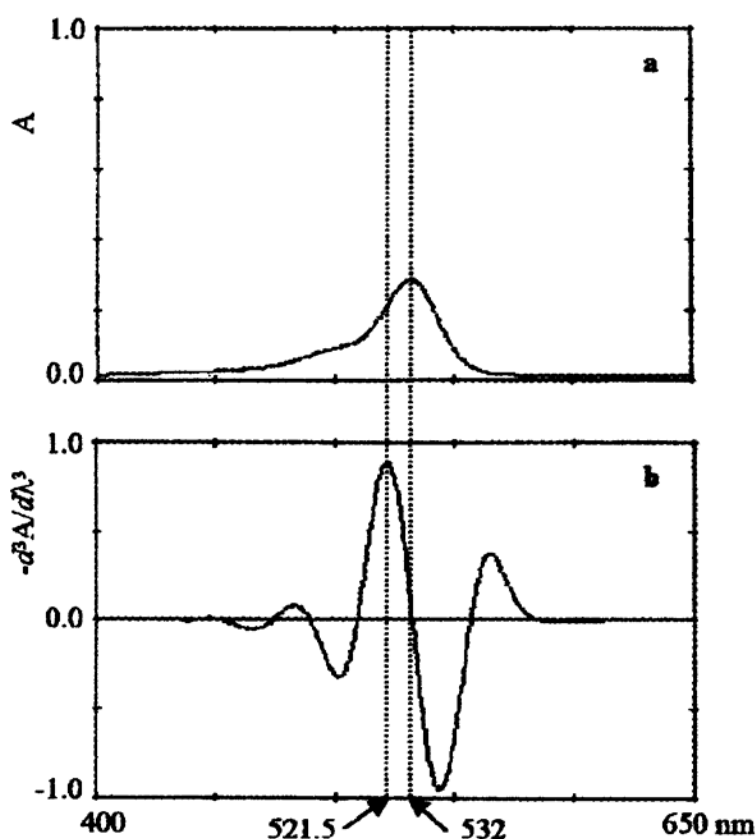


Figura 19. Espectro de absorción registrado directamente (a) 3^{a} derivada del espectro de absorción (b) correspondiente al producto de reacción obtenido frente al ATB (Grau y col. 2000a).

La variante de Botsoglou y col. (1994) en lugar de registrar directamente la absorbancia a 530-535 nm, registra la tercera derivada y mide la altura del pico a 521.5 nm (Figura 19). El autor ensayó el método en una larga serie de alimentos y tejidos y encontró unos valores de recuperación bastante buenos, con una excelente precisión (coeficientes de variación entre 0,8 y 4.5%). Grau y col. (2000a) modificaron levemente el método propuesto por Botsoglou y col. (1994) y consiguieron aumentar significativamente su precisión, cuando lo aplicaron a muestras de muslo de pollo.

El índice del ácido tiobarbitúrico ha sido utilizado como una determinación de la oxidación en aceites (Dana y col., 2003; Chan y Tan, 1999; Sebedio y col., 1991; Yang y col. 1991; Guillén y col., 1988). La formación de MDA depende del contenido en AGPI del aceite a analizar, presentando una mayor sensibilidad en aceites con mayor grado de insaturación. Se ha considerado un parámetro eficaz para medir la oxidación lipídica en aceites de canola o soja (Kishida y col, 1993; Dana y col., 1993), mientras que muestra una baja sensibilidad en el aceite de palma durante la fritura industrial (Sebedio y col., 1991).

II.6.7. Compuestos volátiles

Obviamente, la mejor manera de evaluar los compuestos de oxidación lipídica directamente relacionados con la rancidez sensorial, es la determinación directa de los componentes volátiles originados durante la destrucción de los peróxidos lipídicos (compuestos secundarios volátiles). El método más utilizado en la actualidad para esta determinación es la cromatografía de gases.

La aplicación de esta técnica presenta numerosas ventajas, además de su inmejorable correlación con la evaluación sensorial, ya que es muy sensible y permite un seguimiento de la oxidación de una grasa desde estadios muy iniciales. No obstante, un punto crítico es la selección de los compuestos principales a determinar, ya que el número total de compuestos volátiles que se pueden formar es grande y, además, variable en función de los AG insaturados que predominan en la grasa. Otros factores fundamentales son las condiciones del sistema cromatográfico, que pueden modificar la resolución y elución respectiva de los componentes en el sistema elegido. Dada la complejidad de la fracción volátil y su variabilidad entre grasas, debe ponerse gran atención en la identificación correcta de los picos y en la resolución del sistema, para mejorar la selectividad y evitar errores de cuantificación. Así mismo, las posibles pérdidas por volatilización o fijación parcial de los compuestos volátiles a analizar pueden dar lugar a errores significativos de medida.

Entre los métodos de este tipo más utilizados se encuentran tres sistemas: la cromatografía de gases directa, el espacio en cabeza estático y el espacio en

cabeza dinámico, cada una de ellas con sus ventajas y desventajas de aplicación práctica (Przybylski y Eskin, 1995; Min y Kim, 1985).

En teoría, el sistema con mayores ventajas es el de la CG directa, que evita la necesidad de un enriquecimiento de la concentración de compuestos volátiles y que presenta unos límites de detección suficientemente bajos. No obstante, este sistema exige la utilización de una unidad anexa, complementaria al inyector, que se acopla al cromatógrafo de gases. Existen diferentes tipos de unidades, de los cuales el tipo más simple no es más que un inyector modificado que permite inyectar en su interior la grasa y que transfiere los volátiles directamente a la columna cromatográfica. Un segundo tipo consiste en una columna adsorbente termostaticada (con relleno Porapak o Tenax), donde se inyecta la grasa, y que está conectada al cromatógrafo de gases. Estos sistemas de inyección directa son los más simples y los que presentan menos riesgos de errores por pérdidas de componentes. No obstante, como principales desventajas cabe citar: a) los métodos que utilizan columnas adsorbentes pierden su simplicidad y no presentan ventajas importantes respecto a los sistemas de espacio en cabeza dinámico o estático; b) la volatilización depende en forma muy crítica de las condiciones del inyector (es especialmente importante, tener en cuenta la formación acelerada de compuestos secundarios de oxidación a partir de los peróxidos, a las elevadas temperaturas del inyector); y c) frecuentemente, la anchura de los picos suele ser excesiva al trabajar a bajas temperaturas.

Las técnicas más clásicas son las denominadas de espacio en cabeza estático, que consisten en equilibrar (a temperatura controlada) una grasa o alimento dentro de un recipiente o vial cerrado y la posterior inyección en un CG de un volumen determinado de la atmósfera o espacio en cabeza del vial (Figura 20), donde se habrá acumulado una concentración de componentes volátiles proporcional al grado de oxidación del alimento. Los puntos críticos de este sistema se pueden resumir en los siguientes: a) la temperatura de equilibrio condiciona la volatilización (y la formación de artefactos de oxidación si la temperatura es alta); b) la diferente solubilidad de cada componente volátil en la grasa o alimento favorece en forma variable la volatilización de cada uno; y c) alcanzar un equilibrio es lento y el método exige bastantes horas y es difícil conseguir elevadas concentraciones de compuestos volátiles en el espacio en

cabeza. Es un sistema que permite una buena automatización, lo que mejora enormemente la reproducibilidad de los resultados.

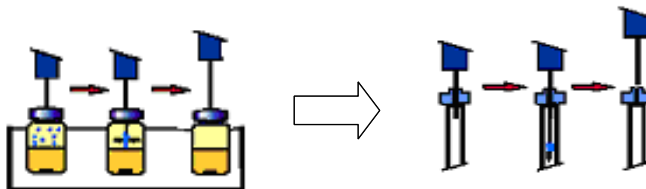
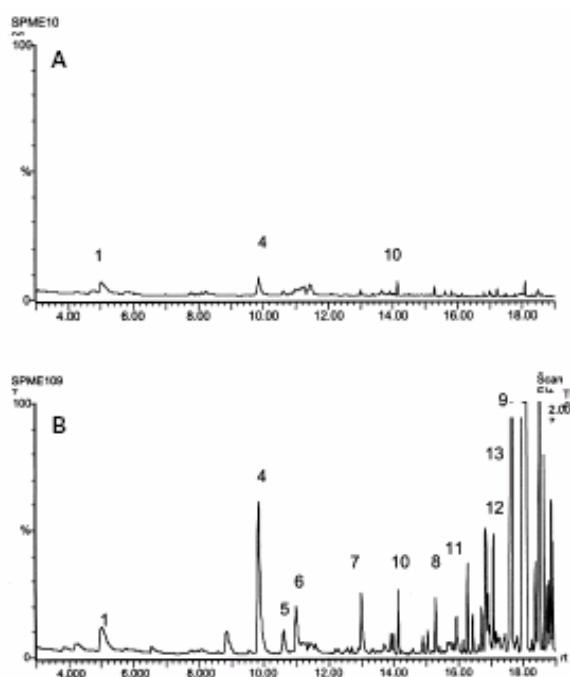


Figura 20. Esquema del proceso de determinación de compuestos volátiles mediante la técnica de espacio en cabeza (Peñalver, 2002).

El último tipo de técnica es el espacio en cabeza dinámico, que consiste en el arrastre con nitrógeno de los compuestos que se volatilizan de la muestra, hasta una trampa con polímeros adsorbentes (Chromosorbs, Porapak o Tenax) que los retiene y los concentra. Estos compuestos retenidos son posteriormente eluidos con disolventes o térmicamente, para su inyección en el cromatógrafo de gases. Este sistema presenta la ventaja, frente al estático, de no depender del equilibrio de fases y de separar más cuantitativamente los compuestos volátiles, por lo que mejora su límite de detección. No obstante, como es obvio, es un método menos simple, lo que implica algunas desventajas. Entre ellas cabe destacar: a) la naturaleza del adsorbente varía la retención relativa de compuestos; b) la separación y transferencia de los compuestos desde el adsorbente al cromatógrafo requiere una manipulación compleja, que dificulta una determinación cuantitativa; y c) las variaciones de temperatura a lo largo del proceso de volatilización y adsorción pueden provocar condensaciones de compuestos. Entre los sistemas de desorción de los compuestos volátiles, por elución con disolvente o por desorción térmica, existe una difícil alternativa, ya que ambos métodos tienen sus ventajas y sus inconvenientes. La elución con disolventes implica una menor recuperación, con límites de detección más altos y la presencia de restos de disolvente interfiere en la determinación. La desorción térmica ofrece mejores límites de detección, pero necesita de elevadas temperaturas, que pueden favorecer la formación de artefactos.

Los componentes volátiles mayoritarios, formados durante la oxidación secundaria de los ácidos grasos, como ya hemos visto en el apartado II.3, pueden reducirse a un número bastante limitado, aunque pueden apreciarse una larga serie de compuestos minoritarios. Pentano, hexanal, propanal, 2,4-decadienal, como mayoritarios, y 2-hexenal, pentanol, heptanal, 2-heptenal, 2-octenal como minoritarios, han sido determinados por diversos autores con éxito (Takeoka y col., 1995, 1996; Perkins, 1996), utilizando estas técnicas de cromatografía de gases como herramienta para la evaluación de la rancidez oxidativa (Figura 21).



(1) hexanal, (4) t-2-heptenal, (5) 1-octen-3-ol, (6) 2-pentilfurano, (7) t-2-octenal (10) nonanal, (8) t-2-nonenal, (11) t,t-2,4-nonadienal, (12) t-2-decenal, (13) t,c-2,4-decadienal, (9) t,t-2,4-decadienal.

Figura 21. Perfil cromatográfico de componentes concentrados por microextracción en fase sólida de un aceite de girasol (A) antes de ser sometido a fritura y (B) después del tercer día fritura (Doleschall y col., 2003).

Un punto de gran interés es la correlación de esta determinación concreta de compuestos de oxidación por CG con la evaluación mediante otros métodos químicos (IP, IA, % DC, etc.), y con la evaluación sensorial de la rancidez en los aceites y muestras con un alto contenido en grasas, durante el almacenamiento en diferentes condiciones. Muchos autores han descrito la excelente correlación obtenida entre las concentraciones de pentano y hexanal y el IP (Waltking y Zmachinski, 1977; Evans y col., 1969) así como con la intensidad del flavor a

rancio (Morrison y col., 1981; Warner y col., 1978, Min y Schweizer 1983), lo que presupone que pueden utilizarse sus cifras como predicción de la alteración del flavor. Sin embargo, el flavor no depende de un solo componente, sino de la interacción de una gran cantidad de compuestos (Takeoka, y col., 1996). Por ello, algunos autores (Warner y Nelsen, 1996; Prybylski y Eskin, 1995) recogen la dificultad y confusión de los panelistas para definir ciertos descriptores, presentándose bajas correlaciones con algunos de los compuestos volátiles determinados. No obstante, algunos autores (Andrikopoulos y col., 2004; Frankel y col., 1998) señalaron que el 2,4-decadienal es un marcador sensible en aceites sometidos a fritura y que presenta una buena correlación con la evaluación sensorial de diversos aceites vegetales y con su índice de peróxidos (IP).

II.6.8. Ácidos grasos oxidados/Triacilgliceroles oxidados

Un método simplificado para determinar conjuntamente todas las formas oxidadas, en forma de ácidos grasos libres, es el propuesto por Billek y col. (1978). La grasa de fritura se saponifica (KOH etanólico), se acidifica con HCl etanólico para obtener los ácidos grasos libres (AGL), que se extraen con éter de petróleo. Como los AG oxidados son insolubles en éter de petróleo, la fracción que queda insoluble se lava y pesa y corresponderá a los mismos. Por ello, este parámetro suele denominarse comúnmente como % AG insolubles en éter de petróleo (IUPAC 2604, AOAC 977.17, UNE 55.008). Es una medida aproximada, que no permite obtener resultados totalmente reproducibles, aunque su sencillez la hace útil a efectos de control de rutina.

Un método más selectivo es el propuesto por Pérez-Camino y col. (1990), que realiza la determinación del total de formas oxidadas de los triacilgliceroles sin hidrolizar. El procedimiento tiene una primera fase de separación en columna de silicagel, idéntica a la de obtención de compuestos polares (apartado II.6.10.1). En una segunda fase, la fracción correspondiente a estos compuestos polares se somete a CLAE sobre columnas de exclusión molecular, que permite aislar y cuantificar, muy específicamente, la banda correspondiente a los llamados triacilgliceroles oxidados, que reúne los diversos productos de oxidación formados a partir de las moléculas de los triacilgliceroles. Al mismo tiempo, el método presenta la ventaja, de que podemos paralelamente cuantificar otras bandas

correspondientes a otros productos de alteración polares (AG libres, DG, y dímeros polares de los triacilgliceroles, principalmente). La Figura 22 recoge un esquema de este interesante método.

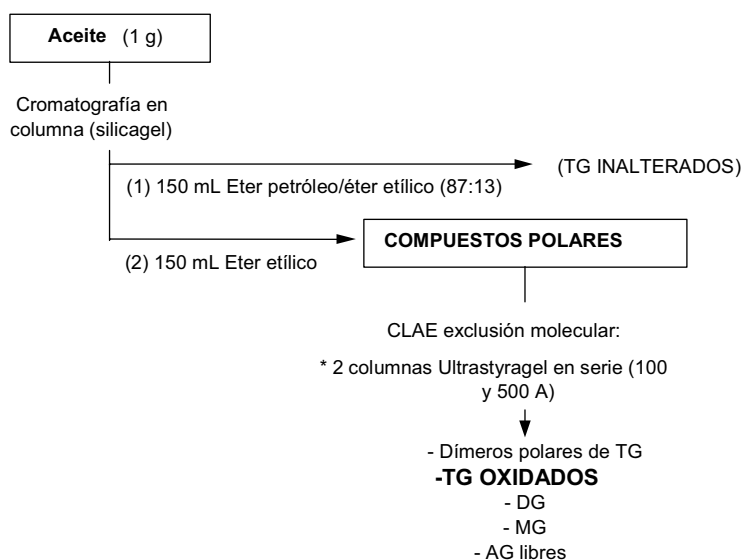


Figura 22. Determinación de triacilgliceroles oxidados (Pérez-Camino y col., 1990).

No obstante, la tendencia es hacia la determinación en la forma de ésteres metílicos de los ácidos grasos oxidados, en lugar de los TG oxidados sin hidrolizar, ya que en la forma de AG libres disminuye el número de especies químicas diferentes que podemos obtener, además de que permite evaluar el total de cadenas de AG no oxidadas y total de cadenas oxidadas de una forma más fácil y más exacta.

Por esta razón, un tercer tipo de métodos que son los más utilizados se basan en la cromatografía de gases, para la determinación por diferencia de los compuestos oxidados, previa formación de los ésteres metílicos, lo que habitualmente se denomina determinación del porcentaje de compuestos no eluibles (AOAC 977.17). Este tipo de determinación es más interesante en las grasas de fritura para seguir su alteración, ya que podemos conocer más específicamente como se afectan los AG insaturados, lo que suministra una información más completa que la simple cifra total de TG oxidados.

El método es relativamente simple, se basa en añadir un peso conocido de un triglicérido homogéneo (ej. triheptadecanoato de glicerol) como patrón interno a un peso conocido de la grasa, preparar los ésteres metílicos de los AG (según un

método normalizado para la determinación de la composición en AG) e inyectarlos en un cromatógrafo con una columna empaquetada con una fase estacionaria al 3% de metilsilicona sobre soporte inerte de tierra de diatomeas. Comparando el área obtenida para el patrón interno con la suma de áreas totales se obtendrá un valor del total de AG eluidos, que debería corresponder al peso total de grasa. Como se obtienen valores inferiores, se asume que la diferencia corresponde a los compuestos de alteración polares que no eluyen de la columna cromatográfica. Esta diferencia se cuantifica como % de materia no eluible, según la fórmula

$$\% \text{ materia no eluible} = \frac{[A_{pi} (P_{pi} + P/P_{pi}) - A] \times 100}{A_{pi} \times [(P_{pi} + P/P_{pi}) - 1]}$$

, donde, A_{pi} = área del patrón interno; A = suma de áreas total del cromatograma; P_{pi} = peso del patrón interno; P = peso de la grasa.

Un estudio realizado entre diferentes laboratorios (Waltking, 1975), en el que se comparó este método con la determinación de polímeros por cromatografía de exclusión molecular, mostró que los valores de materia no eluible son superiores a los de polímeros en un aceite de fritura, aumentando mucho la diferencia con el grado de utilización del aceite. La precisión para el método ensayado resultó muy buena, aunque algo dependiente de la preparación de los ésteres metílicos y de la inyección en el cromatógrafo. A partir de este método, diversos autores han propuesto métodos que combinan diferentes etapas de separación en columna, sobre los ésteres metílicos obtenidos de la grasa de fritura, para obtener diversas subfracciones que se cuantifican por pesada de los residuos respectivos, o por cromatografía de gases. Resulta por lo tanto una metodología versátil y que permite diferentes aplicaciones y determinaciones, según las necesidades o según la habilidad y conocimientos del analista.

Un ejemplo interesante es el propuesto por Gardner y col. (1992), cuyo esquema se recoge en la Figura 23. Consta de una primera etapa de fraccionamiento de los ésteres metílicos de la grasa, por cromatografía en columna de silicagel, con 4 eluyentes diferentes, y un segundo fraccionamiento sobre cartucho de fase apolar (C_{18}), para separar la subfracción de ésteres metílicos oxidados, a partir de la

fracción de ésteres metílicos alterados (la tercera de las fracciones obtenidas anteriormente). Finalmente, aplica la cromatografía de gases (CG) acoplada a espectrometría de masas (EM) y a la espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR), para la identificación y cuantificación individualizada de los principales componentes de estas fracciones. Una etapa muy importante para la obtención de una buena exactitud de los resultados es la preparación de los ésteres metílicos que, según los trabajos de Dobarganes y col. (1984a, 1984b), debe evitar la transesterificación en medio ácido, con trifluoruro de boro, que puede destruir algunos ésteres metílicos oxidados (obteniendo cifras de ésteres metílicos totales oxidados inferiores). Así pues se recomienda utilizar exclusivamente la reacción con metóxido sódico (método recomendado por la IUPAC 2301, UNE 55.37).

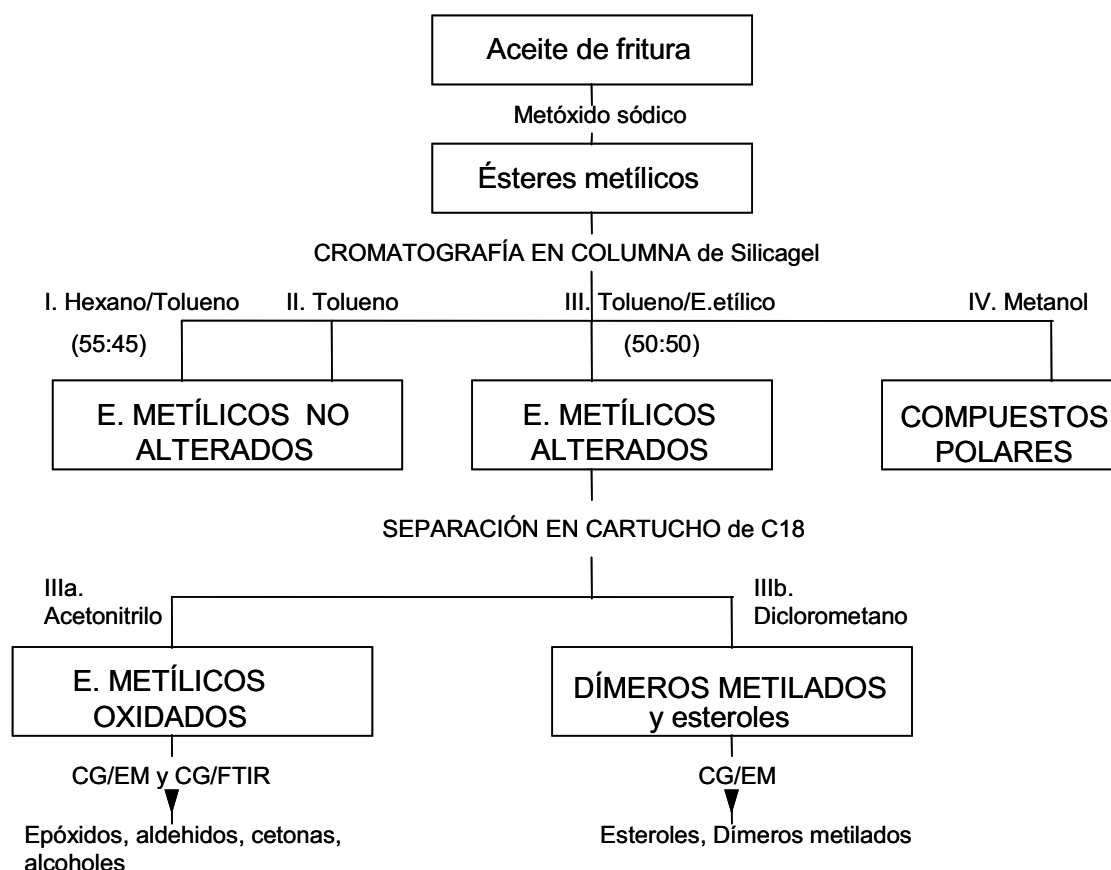


Figura 23. Identificación y cuantificación de las diferentes clases de compuestos de alteración en aceites de fritura (Gardner y col., 1992).

Otro método interesante en este campo es el propuesto por Dobarganes y Pérez-Camino (1988), que aplica también una secuencia de fraccionamientos en

columna, acoplado a la cromatografía de gases, para separar y cuantificar los porcentajes de ésteres metílicos no polares totales (reuniendo los procedentes de TG polares y no polares) y de dímeros no polares, este método evita la presencia de compuestos de oxidación de elevada polaridad en la muestra de compuestos de elevado peso molecular que quedarían retenidos en la columna utilizada en el cromatógrafo de gases. El esquema del procedimiento, que se recoge en la Figura 24, consta de un primer fraccionamiento de la grasa de fritura por cromatografía en columna, eluyendo la fracción no polar con una mezcla de hexano/éter etílico (90:10) y la fracción polar con éter etílico (Figura 24, fracciones b_1 y b_2). En la primera de estas fracciones se determinan los ésteres metílicos no polares por cromatografía de gases (Figura 25). A continuación, se obtienen los ésteres metílicos de la fracción de TG polares antes obtenidos (b_2) y se fraccionan por cromatografía en columna, empleando ahora una mezcla hexano/éter etílico (88:12) (Figura 24, fracción c). Se recupera, así, una subfracción más apolar (c), que contendrá los ésteres metílicos no polares y los ésteres metílicos de los dímeros no polares, que se cuantifican por cromatografía de gases (Figura 25). El porcentaje de ésteres metílicos no polares totales se obtendrá sumando los cuantificados a partir de las fracciones b_1 y c en las dos etapas de fraccionamiento. Cuanto menor sea esta suma mayor será la alteración global del aceite de fritura. En cambio, el valor de ésteres metílicos de los dímeros no polares es un buen indicador de la alteración térmica y su valor aumenta a medida que aumenta la alteración del aceite (Dobarganes y col., 1984a, 1984b; Dobarganes y Márquez-Ruiz, 1988, 1996).

A modo de ejemplo, se compararon los porcentajes de ésteres metílicos no polares totales y ésteres metílicos de dímeros no polares de dos aceites (aceite de palma y aceite de soja) antes y después de ser sometidos a calentamiento durante 100 h. Ambos aceites presentaron inicialmente porcentajes superiores al 98% de EM no polares totales e inferiores al 1% de EM de dímeros no polares. Sin embargo, después de ser calentados el porcentaje de EM no polares totales fue de 70,1% para el aceite de palma y 56,2% para el aceite de soja, mientras los porcentajes de EM de dímeros no polares fueron de 6,1% y 14,5% para estos dos aceites, respectivamente (Dobarganes y Pérez-Camino, 1988).

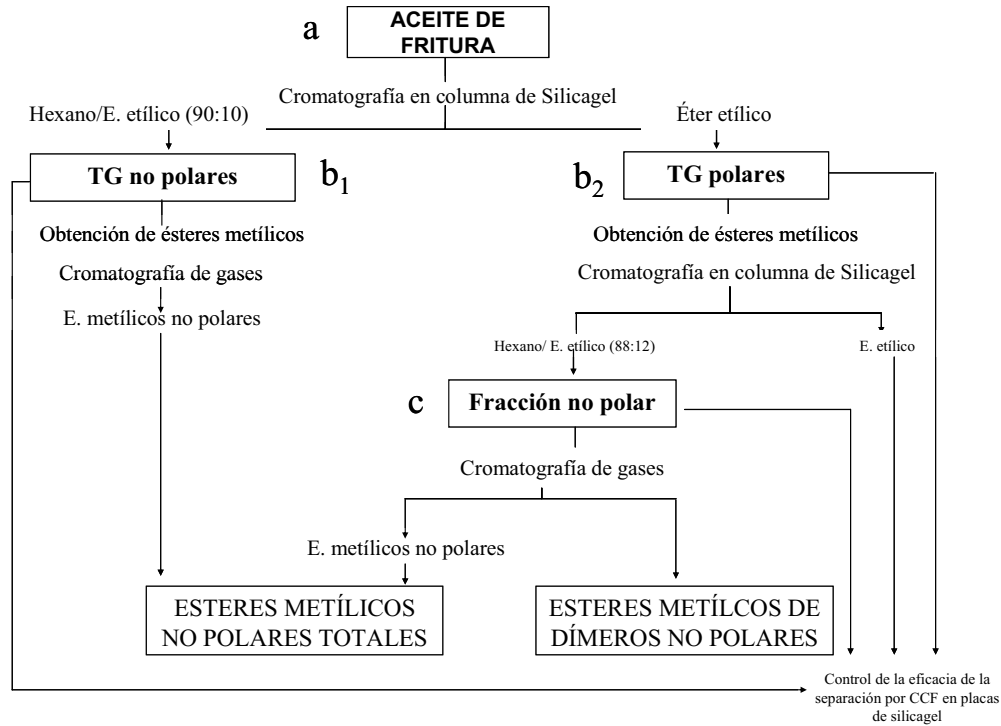


Figura 24. Determinación de las fracciones de dímeros y de ésteres metílicos no polares en aceites calentados (Dobarganes y Pérez-Camino, 1988).

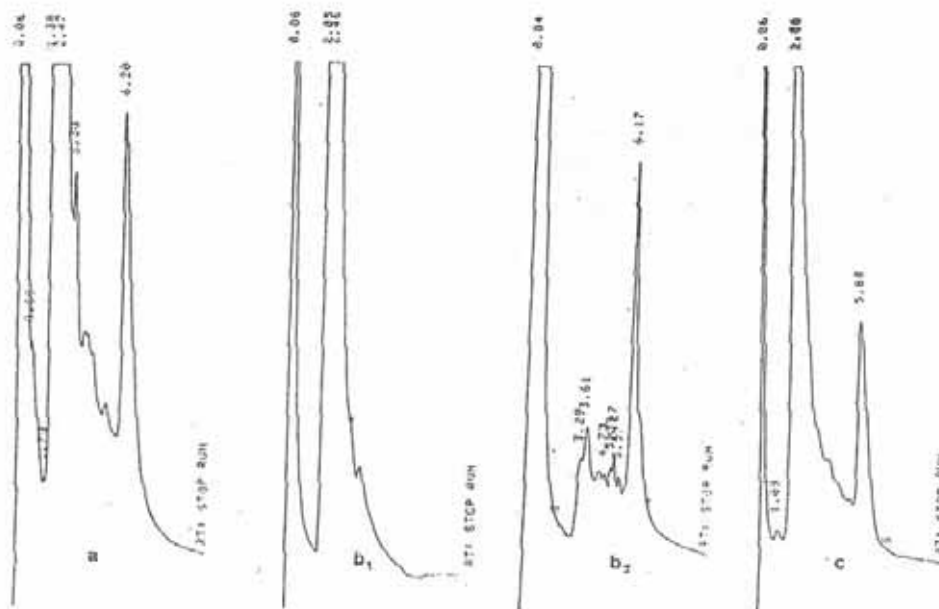


Figura 25. Determinación por CG de los ésteres metílicos totales (a), las fracciones no polar y polar obtenidas mediante cromatografía en columna de sílice (b₁ y b₂) y la fracción obtenida mediante cromatografía en columna con éter de petróleo/éter etílico 88:12 (c) (Dobarganes y col., 1984b).

Un método más sistemático es el propuesto por Márquez-Ruiz y col. (1995), combina el fraccionamiento en columna y la determinación gravimétrica de algunas fracciones, con la formación de ésteres metílicos de los ácidos grasos, que se fraccionan en columna y se someten a CLAE de exclusión molecular. Se consigue así una evaluación de los aceites de fritura en relación con los % que contengan de cada una de las siguientes fracciones cuantificadas de compuestos polares, polímeros de los ácidos grasos, dímeros de AG no polares, monómeros de AG no polares, dímeros de AG oxidados y monómeros de AG oxidados (ver Figura 26).

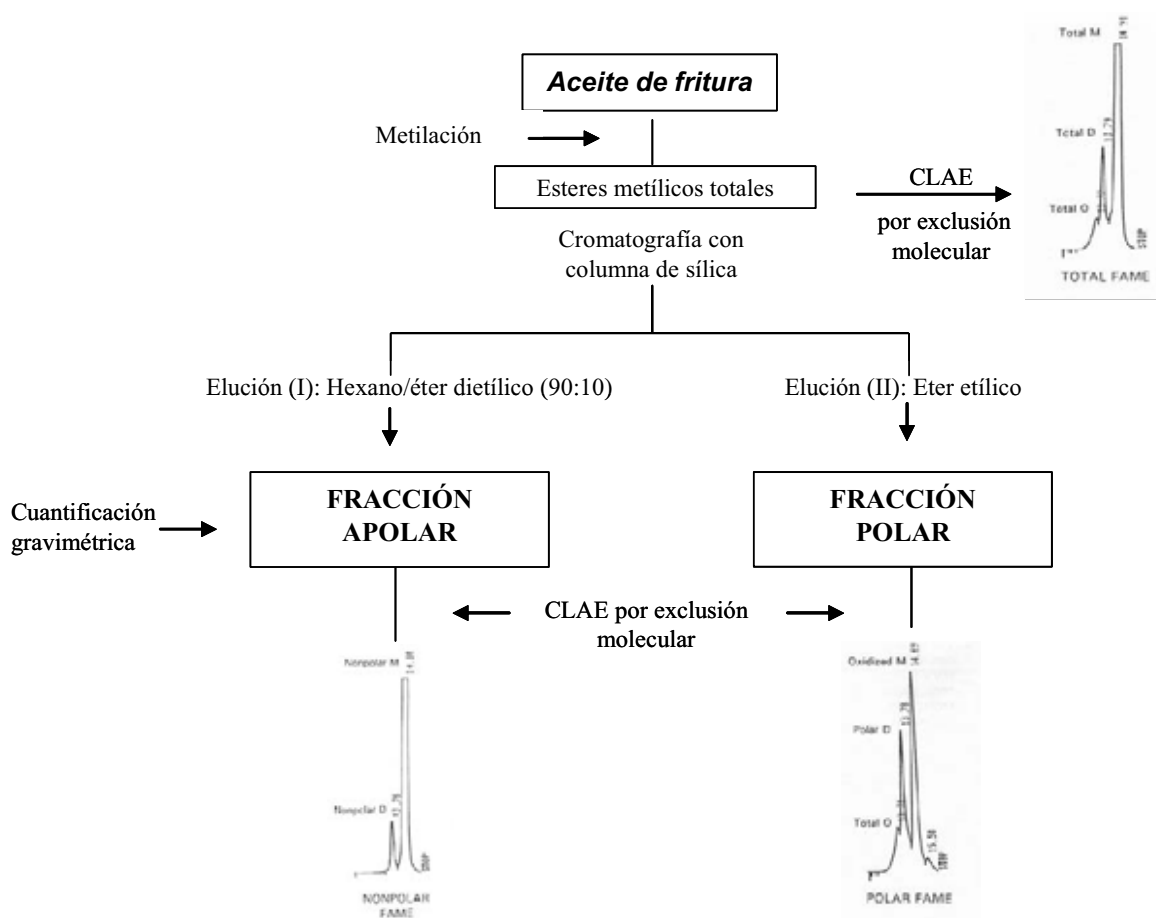


Figura 26. Esquema del fraccionamiento en columna de silicagel y de la determinación por CLAE de exclusión molecular de los esteres metílicos de aceites sometidos a fritura y de sus fracciones polares y apolares. Abreviaciones: M, Monómeros; D, Dímeros; O, Oligómeros; y FAME, ésteres metílicos de los ácidos grasos (Márquez-Ruiz y col., 1995).

II.6.9. Monómeros cíclicos

La determinación selectiva de los monómeros cíclicos no oxidados en aceites de fritura es un campo de gran interés, ya que se ha comprobado que son fácilmente absorbidos en el intestino y que en animales de experimentación pueden afectar la funcionalidad de diversos órganos y tejidos (Christie y Dobson, 2000; Sebedio y Chardigny, 1996; Viola y Bianchi, 1988). Pero desde el punto de vista analítico, su análisis reviste dificultades importantes, ya que exige etapas complejas de fraccionamiento, que son tediosas y requiere de técnicos especializados.

Un esquema general del proceso (Gere y col., 1984; Gente y Guillaumin, 1977) comprende la formación de los ésteres metílicos, posterior hidrogenación (para simplificar el análisis eliminando isómeros) y fraccionamiento con urea (para aislar los monómeros cíclicos de los AG saturados análogos, que tendrían una elución similar en la columna cromatográfica), con determinación final por cromatografía de gases/espectrometría de masas. Métodos alternativos intentan mejorar la purificación por formación de aductos con urea, sustituyéndola por la ozonólisis. Además, la utilización de la espectrometría de masas y/o de la espectrofotometría IR con transformada de Fourier son herramientas imprescindibles para una correcta identificación de los monómeros cíclicos aislados.

Esta determinación se ve comprometida por diversos factores que disminuyen la exactitud de la medida, como son:

- a) baja concentración de los monómeros cíclicos en muestras poco alteradas, lo que exige un perfecto aislamiento y una gran concentración de los extractos.
- b) interferencia de algunos AG saturados presentes en elevada proporción en los extractos de ésteres metílicos hidrogenados (sobre todo C_{18:0}), que tienen un tiempo de retención cercano a algunos monómeros cíclicos.
- c) la dificultad de selección y obtención de patrones para la determinación de monómeros cíclicos.

Ello exige mejorar ciertos aspectos del procedimiento, lo que se ha intentado a través de las siguientes estrategias: separación de los monómeros cíclicos por sistemas alternativos a la formación de aductos con urea (ozonólisis, CLAE

preparativa, cristalización selectiva, extracción en fase sólida); uso de columnas capilares con fases estacionarias de extrema polaridad; y la utilización como patrón internos de compuestos con una estructura y comportamiento analítico lo más similar posible a los monómeros cíclicos hallados en el aceite (Le-Queré y Sebedio, 1996). Un esquema clásico de este tipo de métodos, propuesto por Rojo y Perkins (1987), se recoge en la Figura 27.

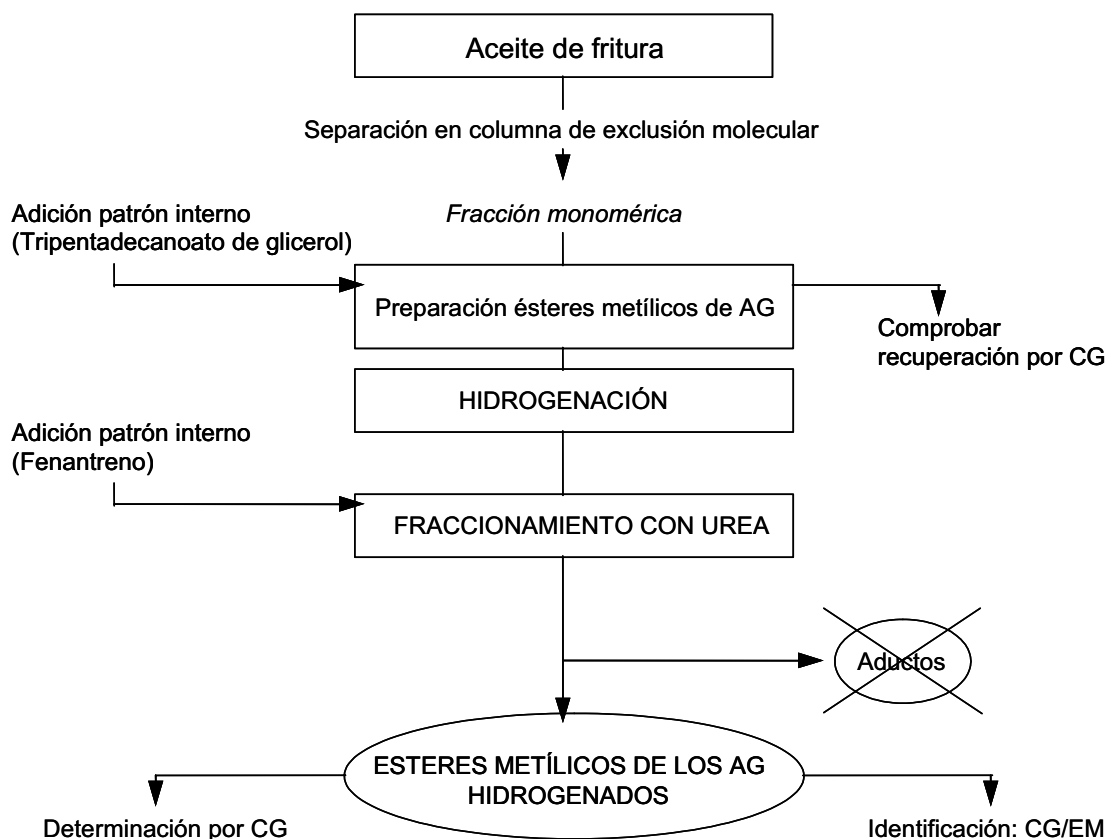
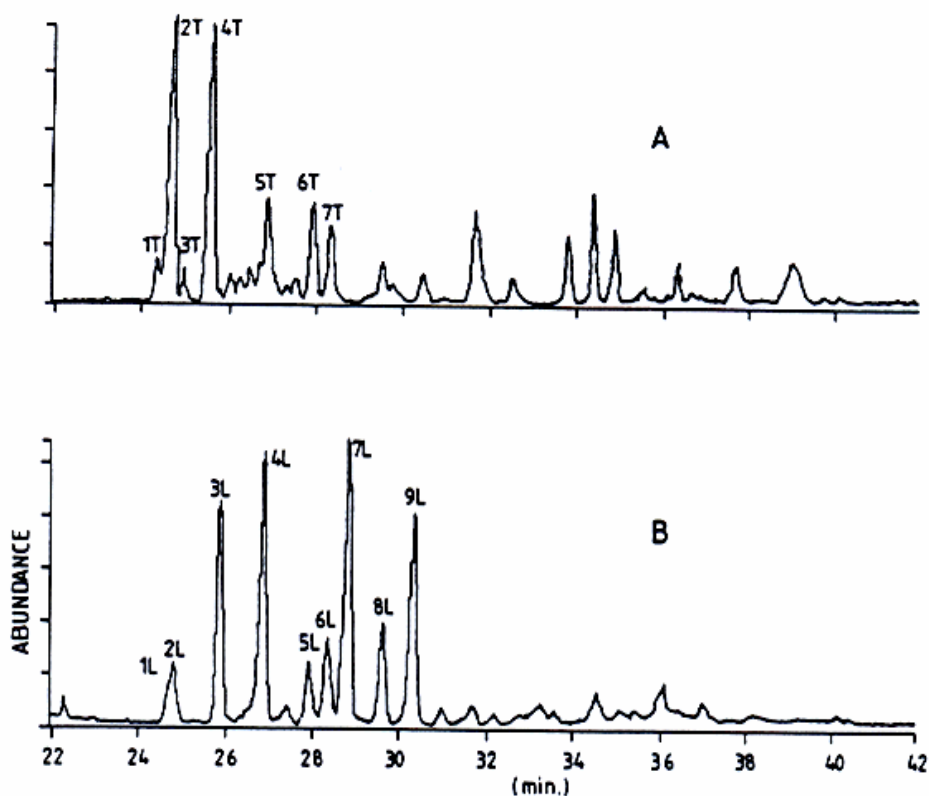


Figura 27. Esquema del método propuesto por Rojo y Perkins (1987), para la determinación de monómeros cíclicos de los AG en aceites de fritura.

A pesar de la complejidad que presenta esta determinación, en la actualidad se dispone de herramientas analíticas y estudios suficientes para poder plantear dicha determinación como un parámetro de interés en la evaluación de los aceites calentados o sometidos a fritura. La aplicación práctica de este método pasa por el conocimiento de los mecanismos de formación de estos monómeros y de los compuestos formados en cada tipo de aceite, para centrar el análisis en unos determinados monómeros cíclicos. Por ejemplo, la Figura 28 muestra el cromatograma correspondiente a los principales monómeros cíclicos detectados

en aceites de girasol y linaza calentados (Sebedio y col., 1989), utilizando la técnica de CG/EM.

Sebedio y col. (1996) obtuvieron valores en aceites de cacahuete y soja, y en el producto frito correspondiente, sometidos a fritura a diferentes temperaturas que no superaban en total el 0,17% de monómeros cíclicos respecto al total de la grasa.



- 3L= metil-9-(2-butilciclopentil) nonanoato *trans*
 4L= metil-10-(2-propilciclopentil) decanoato *trans*
 6L= metil-9-(2-butilciclopentil) nonanoato *cis*
 7L= metil-9-(2-propilciclohexil) nonanoato *trans*
 8L= metil-10-(2-propilciclopentil) decanoato *cis*
 9L= metil-9-(2-propilciclohexil) nonanoato *cis*
 2T= metil-7-(2-hexilciclopentil) heptanoato *trans*
 4T= metil-9-(2-butilciclopentil) nonanoato *trans*
 5T= metil-7-(2-hexilciclopentil) heptanoato *cis*
 6T= metil-9-(2-butilciclopentil) nonanoato *cis*
 7T= metil-9-(2-propilciclohexil) nonanoato *trans*

Figura 28. Determinación por CG/EM de monómeros cíclicos de los AG, aislados de aceites de girasol (A) y de linaza (B) calentados (Sebedio y col., 1989).

II.6.10. Métodos para la determinación de polímeros y compuestos polares de los triacilgliceroles

II.6.10.1. Compuestos polares

El método fue propuesto inicialmente por Guhr y Waibel (1978), hoy en día, con escasas modificaciones, constituye el método oficial en casi todos los países (AOCS Cd 20-91, IUPAC 2507, ISO 8420, AOAC 28.074, BOE 1989). Consiste en un fraccionamiento en columna de adsorción (silicagel de humedad controlada al 5%), bajo el principio de que la mayoría de los compuestos de alteración formados durante la fritura (DG, MG, AG libres, TG oxidados, compuestos secundarios de oxidación, dímeros y polímeros oxidados, etc.) son más polares que los TG intactos. De esta forma, una vez adsorbida la grasa o aceite a ensayar, se eluye con un disolvente de naturaleza más bien apolar (hexano/éter etílico 87:13 ó éter de petróleo/éter etílico 87:13) y se separan de la columna los TG inalterados. Se obtiene el residuo por evaporación, se pesa y se resta del peso inicial de grasa, para conocer el % de compuestos polares retenidos. En algunos métodos propuestos, se realiza una segunda elución con éter etílico, que arrastra los compuestos polares, cuyo peso se determina entonces directamente, en lugar de hacerlo por diferencia. La Figura 29 muestra un esquema de la determinación.

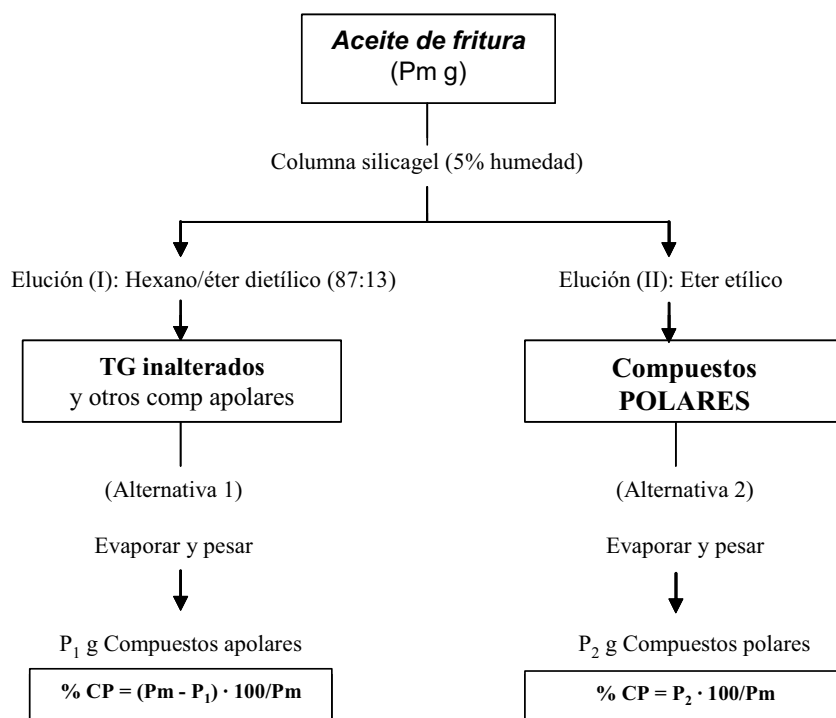


Figura 29. Esquema de la determinación del % de compuestos polares, según los métodos oficiales.

Lógicamente, como en todo fraccionamiento en columna, cabe controlar los diversos factores que influyen en la exactitud y reproducibilidad del análisis: naturaleza y humedad del adsorbente; velocidad de elución; naturaleza y volumen de los eluyentes; tipo, tamaño y material de la columna, etc. Por ello, es siempre conveniente seguir métodos normalizados. Es importante este punto, ya que las grasas analizadas deben cumplir los límites establecidos por la normativa, con resultados obtenidos según el procedimiento establecido también por norma.

Existen algunas propuestas alternativas, que intentan mejorar la exactitud y reproducibilidad, así como simplificar y acelerar la determinación, como es la de Paradis y Nawar, (1981b), que utiliza la CG, o la de Sebedio y col. (1986) y Márquez-Ruiz y col. (1996a) que es similar al método oficial, pero a escala micro (cartucho de silicagel en lugar de columna), lo que acorta el proceso y ahorra disolventes.

No obstante, el método puede presentar un funcionamiento variable según la naturaleza de la grasa problema y de la diferente proporción de compuestos de alteración presentes. Así, se cree que los epóxidos no son retenidos. Además, en el caso de las grasas altamente hidrolizadas, que contienen proporciones altas de MG, DG y AGL, estos compuestos interactúan fuertemente con el adsorbente y

modifican el funcionamiento de la separación, pudiendo entonces ser eluidos algunos compuestos polares con la fracción apolar. De forma general, podría concluirse que el método no es muy exacto ni preciso, por lo que su fiabilidad podría asegurarse sólo para valores superiores al 8-10 % de compuestos polares, lo que es suficiente a efectos de evaluar si supera o no el 25-27 % establecido como máximo para las grasas y aceites de fritura en la mayoría de las normativas (Tabla 14, apartado II.7.2). Un estudio de colaboración entre 19 laboratorios (Walting y Wessels, 1981), que originó la propuesta de método oficial por la IUPAC, mostró unos valores de % CV entre 4,3 y 3,5 para valores de compuestos polares comprendidos entre un 8 y un 25%, respectivamente. Dos estudios de colaboración desarrollados con posterioridad bajo la tutela de la IUPAC, entre 1993 y 1996 (Dobarganes y col., 2000b), con la participación de 13 y 10 laboratorios respectivamente, compararon la aplicación del método estándar con un método que utiliza minicolumnas de silicagel. Los resultados muestran una repetibilidad algo peor para la minicolumna: $CV_r = 9,4\%$ para concentraciones del 13,4% de CP para la minicolumna, frente a $CV_r = 3,0\%$ para concentraciones del 13,7% de CP para el método estándar; y $CV_r = 8,9\%$ para concentraciones del 8,7% de CP para la minicolumna, frente a $CV_r = 3,8\%$ para concentraciones del 8,4% de CP para el método estándar.

II.6.10.2. Contenido total de dímeros y polímeros de los triacilglicerol

Para la determinación específica del % total de los dímeros y polímeros de los TG, los métodos que han alcanzado una mayor aplicación separan estos compuestos mediante CLAE sobre fases de exclusión molecular (AOCS Cd 22-91; AOAC 993.25; IUPAC 2.508, AFNOR 60-247).

Uno de los primeros métodos propuestos en este campo es el de Christopoulou y Perkins (1989a), que utiliza dos columnas en serie de estireno/divinilbenceno con límite de exclusión molecular de 2700 daltons, y el tolueno como fase móvil y un refractómetro como sistema de detección. Se consigue así la separación de monómeros, dímeros y trímeros en aceites oxidados térmicamente, y su cuantificación, utilizando la monoestearina como patrón interno. Este estudio compara la aplicación de la cromatografía de exclusión molecular con la

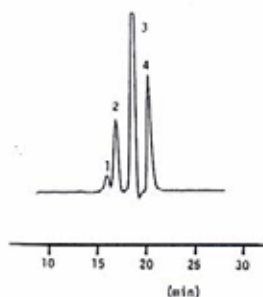
cromatografía de gases con detector de ionización de llama (CG-FID), utilizando una columna de metilsilicona al 3% en soporte de tierra de diatomeas, y dotriacontano como patrón interno para cuantificar el % total de cada una de las fracciones anteriores (monómeros, dímeros y trímeros) en aceite de soja oxidado, obteniendo resultados muy similares entre los dos métodos ensayados (Tabla 12).

Tabla 12. Análisis cuantitativo de diferentes fracciones de un aceite de soja oxidado mediante cromatografía de exclusión molecular y cromatografía de gases (Christopoulou y Perkins, 1989a).

Componentes	CLAE exc. mol.	GC
Trímeros	6.95	6.47
Dímeros	15.23	16.90
Monómeros	77.82	76.63

En la Figura 30 se muestran los cromatogramas obtenidos a partir de ambos métodos para una mezcla de patrones.

(A) 1 - trímeros; 2 - dímeros; 3 - monómeros; 4 - patrón interno, monoestearina



(B) 1 - monómeros; 2 - dímeros; 3 - trímeros; 4- patrón interno, dotriacontano

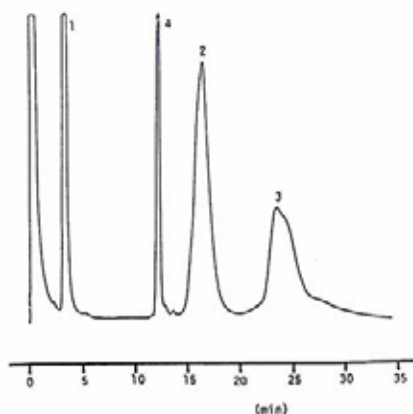
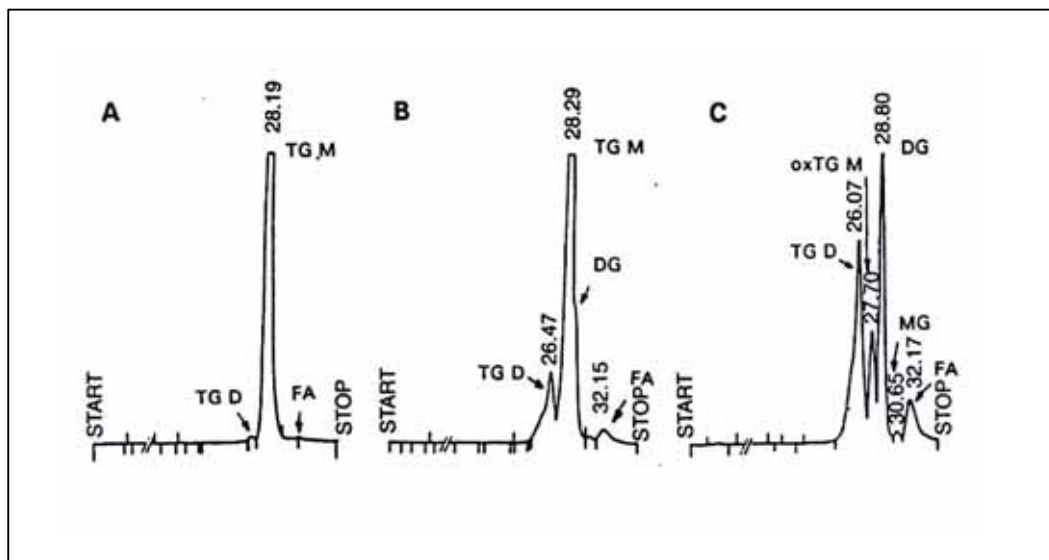


Figura 30. Cromatogramas obtenidos por CLAE de exclusión molecular (A) y por cromatografía de gases sobre una fase OV-1 (3%) (B) a partir de una mezcla de monómeros, dímeros y trímeros (Christopoulou y Perkins, 1989a).

Por otro lado, en las condiciones de los métodos normalizados y recomendados, se obtiene una banda que contiene el conjunto de polímeros de todos los tipos presentes en la grasa de fritura, tanto oxidados como no. Además, los monómeros cíclicos de TG, así como los TG oxidados son coeluidos en la misma banda que los TG inalterados. Finalmente, cuando el aceite de fritura presenta un avanzado estado de alteración, aparecen a continuación las bandas correspondientes a los DG, MG y AG libres. El detector más utilizado es el refractométrico, por su universalidad. El uso alternativo del detector espectrofotométrico (234 nm) no es recomendable, ya que los polímeros no oxidados casi no presentan dobles enlaces conjugados y, por tanto, su absorción es casi nula. En esta determinación se suelen utilizar 2 columnas de acero inoxidable de 30 cm de longitud y 0,77 cm de diámetro interno, rellenas de un gel de un copolímero de estireno/divinilbenceno con un tamaño de partícula inferior a 10 μm y un tamaño de poro de 500 Å y 100 Å , conectadas en serie en este mismo orden.

La fase móvil utilizada es el tetrahidrofurano, o tolueno en su defecto. El método presenta una buena repetibilidad, para contenidos de polímeros del 5% o más ($\text{CV}_r = 6,5\%$ o menor), aunque empeora bastante para valores inferiores ($\text{CV}_r = 13-15\%$ para un 0,6% de contenido), según datos correspondientes a ensayos de intercomparación de la IUPAC (Dobarganes y col., 2000b). Se ha fijado la validez del método a partir de contenidos del 3% de polímeros en la muestra. Aplicaciones de este método a aceites de fritura y sus fracciones polares aisladas se muestran en la Figura 31.



TGD= dímeros y polímeros de triacilglicerol; TGM= monómeros de triacilglicerol (intactos+oxidados); DG= diacilglicerol; MG= monoacilglicerol; FA= ácidos grasos libres; oxTGM= monómeros oxidados de los triacilglicerol

Figura 31. Cromatogramas resultantes del análisis por CLAE de exclusión molecular, de un aceite fresco (A), el mismo aceite calentado (B) y de la fracción polar aislada de este último (C) (Márquez-Ruiz y col., 1990).

La utilización de la CLAE de exclusión molecular se ha extendido mucho en los últimos años, dadas sus enormes posibilidades. Diversos estudios (Gertz y col., 2000; Gertz y Kochhar, 2001; Kochhar y Gertz, 2004) proponen a partir de los polímeros de los triacilglicerol (% PTG) la determinación de la estabilidad oxidativa a elevadas temperaturas (OSET) realizando luego comparaciones con diversos análisis como el Rancimat, total de compuestos polares, el % de AG *trans*, y el porcentaje de ácidos grasos saturados.

$$\text{OSET} = 100 / \text{Contenido PTG (en \%)}$$

Existen numerosos trabajos publicados (Perrin y col., 1984; White y Wang, 1986; Husain y col., 1991; Arroyo y col., 1992; Márquez-Ruiz y col., 1995; Dobarganes y Márquez-Ruiz, 1998) donde se ha aplicado métodos de CLAE de exclusión molecular, introduciendo mejoras constantes, para evaluar la alteración termooxidativa de numerosos tipos de aceites y poder así sacar conclusiones sobre el incremento relativo de cada fracción de compuestos alterados, a lo largo del tiempo de fritura y en diferentes condiciones de temperatura.

Finalmente, no podemos dejar de citar la aplicación de las modernas técnicas de fraccionamiento por extracción con fluidos supercríticos, que algunos autores (Hansen y Artz, 1994) han estudiado y optimizado para el fraccionamiento de los aceites de fritura, obteniendo, en forma sucesiva, una fracción de triacilgliceroles (recuperación = 96%), una segunda fracción de dímeros (recuperación = 87%) y una última de compuestos de bajo peso molecular (DG, MG, AG libres).

II.6.11. Tests rápidos

Resulta evidente la utilidad de disponer de tests sencillos y rápidos, que puedan aplicarse en las industrias sin necesidad de conocimientos ni formación importante por parte de los técnicos (Litovsky y col., 1991). No obstante, el uso de estos tests, en forma de *kits*, implica también riesgos importantes derivados precisamente del mismo desconocimiento y falta de criterio analítico del personal que va a realizar el test al pie de la cuba o en una cocina. Por esta razón, el mal uso o interpretación de los resultados es un riesgo a asumir, pero que debe controlarse en lo posible. Son factores críticos, que deben controlarse, la periodicidad en la realización de los tests, la obtención de resultados siempre comparables (no dudosos), la utilización siempre del mismo tipo de test, la conservación adecuada de los reactivos, y el anotar y evaluar las desviaciones de comportamiento del test, ya que en general presentan una sensibilidad, exactitud y precisión relativamente bajas. No obstante, lo más importante es conseguir una cierta correlación con medidas globales de alteración (principalmente con el % CP), ya que su utilidad es saber el punto de descarte o rechazo del aceite en la cuba de fritura y no una medida cuantitativa exacta del grado de alteración. Finalmente, es importante realizar en el laboratorio, de vez en cuando, la comparación del test con otros parámetros de evaluación, como el índice de acidez, el índice de yodo, o los compuestos polares, para comprobar que existe correlación en la medida.

Bajo diferentes nombres (Fritest, Oxifrit o RAU-Test, Veri-Fry-FFA, Veri-Fry-TAM 150, etc.) se han desarrollado diferentes tests rápidos, de tipo colorimétrico, que usan reacciones con diversos fundamentos y cuyo mecanismo es, a veces, complejo y no totalmente establecido. Estos tests pueden clasificarse en función del tipo de compuestos de alteración a los cuales son sensibles:

Tests de compuestos carbonílicos. El reactivo principal del test es una sustancia que es capaz de reaccionar, de forma más o menos específica, frente a los aldehídos y cetonas, que son compuestos de oxidación secundarios mayoritarios. Este tipo de test se fundamenta en el mismo principio que los índices de carbonilo y de p-anisidina, que ya hemos comentado en los apartados II.6.6.2 y II.6.6.3. Éstos consideran que la concentración de compuestos carbonílicos aumentará de forma proporcional al tiempo de fritura, aunque con unas ciertas limitaciones (von Zedelman, 1973). El más representativo es el denominado Fritest, uno de los tests más clásicos, aunque poco selectivo y sensible, ya que utiliza una escala de tres colores, siendo la intermedia la que señala el punto de descarte del aceite.

Tests de compuestos de alteración. Utilizan unos indicadores de color, que reaccionan de forma proporcional a la presencia de diferentes compuestos de alteración de los aceites sometidos a fritura y que cambian de color en función del grado de alteración global del aceite (Meyer, 1979). El representante más característico de este grupo es el Oxifrit o RAU-Test, que utiliza una escala de cuatro puntos, siendo el tercero, habitualmente, el de descarte. Presenta el inconveniente del uso de disolventes altamente inflamables.

Tests de acidez libre. Utilizan indicadores ácido-base, que varían su coloración en función del pH, de una forma más o menos sensible. Suponen de hecho una simplificación de la medida del índice de acidez, que como ya hemos visto aumenta significativamente con el tiempo de fritura. Un primer tipo es el de los métodos que utilizan tiras indicadoras, especialmente diseñadas para utilizarse con el aceite caliente, con soportes de vidrio o siliconas, que sirven de base a un adsorbente con el indicador (p. ej. verde de bromocresol). Este tipo de ensayo presenta también poca sensibilidad, con escasos puntos en la escala de coloración. Algo más exactos y sensibles son los test en tubo, como el Veri-Fry FFA 500, que presenta una escala más expandida de coloración, que además va acompañada de unas equivalencias aproximadas en % de acidez libre para cada punto. Estos tests presentan correlaciones relativamente buenas con el índice de acidez.

Tests de jabones alcalinos. Estos métodos se basan en el hecho de que los ácidos grasos que se van liberando en los aceites durante la fritura, van

reaccionando parcialmente con sales del alimento, dando lugar a jabones alcalinos. Por lo tanto, aunque es una medida menos sensible, ya que los jabones se acumularán en cantidades inferiores a los ácidos grasos libres, también es una medida que puede tener cierto interés. Un test clásico de este tipo es el Veri-Fry-TAM 150 o el ACM test (Al-Kahtani, 1991; Litovsky y col., 1991; Blumenthal y col., 1985), que utiliza el azul de bromofenol en acetona/agua como reactivo, que se agita con el aceite caliente y se compara el color de la capa inferior transparente con una escala de 5 puntos, para cada uno de los cuales se da una equivalencia en mg/L de oleato sódico.

Test de compuestos polares. Más recientemente, se ha introducido un nuevo tipo de test rápido, basado en la utilización de un reactivo sensible a la mayor parte de compuestos polares originados en el aceite (polímeros, TG oxidados, AG grasos libres, MG, DG, etc.). Uno de estos tests, el TPM Veri-Fry Pro (Xu y col., 1999), utiliza una materia colorante ionizada, encapsulada en una matriz gelatinosa, que es capaz de interactuar con los diversos compuestos polares de alteración, y la intensidad de la coloración originada es proporcional a la cantidad de colorante que interacciona. La medida se realiza espectrofotométricamente a 490 nm, frente a un tubo control con el aceite sólo. La correlación de este test con el método clásico de % CP es alta (0,9 a 0,97), aunque faltan aun estudios que lo apliquen en una mayor diversidad de aceites y alimentos sometidos a fritura.

Como el tipo de medida que realizan es diverso, también las correlaciones de los valores que resultan de aplicar estos tests con los de otros métodos clásicos, son variables. Algunos trabajos disponibles (Croon y col., 1986; Al-Kahtani, 1991), permitirían afirmar, de forma muy general, que los test sensibles a compuestos carbonílicos y a los de compuestos de alteración (Fritest y Oxifrit test o RAU-Test) se correlacionan bien entre sí, pero sus correlaciones con la medida del % CP o de la constante dieléctrica son sólo relativamente buenas y, sobre todo, dependen bastante del tipo de aceite y de la matriz del alimento sometido a la fritura. Los tests de acidez (Veri-Fry FFA 500) presentan correlaciones relativamente buenas con los tests anteriores y también con el % CP y la constante dieléctrica, pero dependiendo de la grasa y condiciones de fritura, así como del tipo de alimento frito. Por el contrario, se correlacionan peor con los tests de materias alcalinas. El

test Veri-Fry-TAM 150, a su vez, presentan correlaciones mediocres con la medida del % CP y de la constante dieléctrica (Al- Kahtani, 1991).

Sin embargo, diversos trabajos (Dobarganes y Márquez-Ruiz, 1998; Croon y col., 1986) ponen de manifiesto la limitación de los tests rápidos para definir el deterioro de una grasa o aceite, ya que algunos de estos tests (Oxifrit, Fritest o Spotest) presentaron falsos positivos y falsos negativos cuando se compararon con los resultados obtenidos mediante la determinación de compuestos polares considerando el 25% de CP como punto de rechazo.

II.6.12. Análisis sensorial del producto frito

El análisis sensorial presenta una enorme utilidad para el establecimiento de la calidad de un producto o materia grasa, así como para detectar su alteración. Existen métodos oficiales normalizados desarrollados para la evaluación sensorial de los aceites (AOCS Cg 2-83) fruto del gran crecimiento de la aplicación del análisis sensorial en productos con elevado contenido en lípidos. Sin embargo, el análisis sensorial se centra en la aceptabilidad del producto de aperitivo frito, objeto de este estudio, más que en evaluar el aceite o medio de fritura.

Para la evaluación sensorial existen dos tipos de paneles: los paneles analíticos y los paneles de consumo (Melton, 1996; Warner, 1995).

Los paneles analíticos evalúan diferencias entre productos y/o valoran la calidad o intensidad de un olor o flavor característico (ej. la sospecha de rancidez en el caso del producto frito). La discriminación entre muestras se realiza mediante los tests de diferenciación (ej. los test triangulares, los duo-trío, las comparaciones apareadas y los métodos de elección forzada). Por otro lado, estos paneles analíticos también describen y/o puntúan la calidad del producto mediante test descriptivos o test de sensibilidad (ej. test de *scaling*). Estos paneles están formados por jueces entrenados, con experiencia y capacidad de evaluar flavors sutiles y distinguir entre *off-flavors*. Los inconvenientes de utilizar un panel de cata entrenado son que normalmente requiere mucho tiempo de formación y su elevado coste.

Por otro lado, los test de consumo son normalmente utilizados como técnicas de evaluación de la preferencia o aceptabilidad de un producto por parte de los

consumidores (Ibáñez y Barcina, 2001). En dichos tests se utiliza un panel no entrenado formado por un grupo importante de personas (normalmente más de 50 personas). Entre los test de consumo destacan las escalas de preferencia que tienen generalmente entre 5-9 categorías con términos hedónicos referentes a características del producto (Melton, 1996). En la Tabla 13, se presenta una escala hedónica utilizada para evaluar la aceptabilidad de patatas fritas.

Tabla 13. Escala hedónica para la evaluación de la aceptabilidad en patatas fritas (Kristott, 2002).

Descripción del sabor	Puntuación del flavor
Extremadamente desagradable	1
Muy desagradable	2
Moderadamente desagradable	3
Suavemente desagradable	4
Ni me gusta ni me disgusta	5
Levemente agradable	6
Moderadamente agradable	7
Muy agradable	8
Extremadamente agradable	9

Los panelistas de tests de consumo pueden llegar a demostrar una gran sensibilidad y a detectar alteraciones del aroma y flavor en los alimentos ricos en grasas. Este hecho tiene una gran repercusión comercial, ya que estos atributos de aroma o flavor son difícilmente detectables y diferenciables aún evaluando químicamente los compuestos de oxidación formados como por ejemplo los compuestos de oxidación volátiles (Gillatt, 2001; Melton y col., 1994; Idris y col., 1992).

El flavor de los productos fritos puede ser evaluado inmediatamente después de ser fritos (ej. pollo o pescado frito), o después de un almacenamiento como es el caso de los productos de aperitivo (ej. patatas fritas tipo *chips*), motivo de estudio en este trabajo.

Warner (1995) considera las patatas fritas tipo *chips* como un ejemplo de producto que recién elaborado presenta una elevada calidad con un flavor característico y ausencia de *off-flavor*, pero que durante el almacenamiento evoluciona originando un deterioro inicial por pérdida del flavor característico, y posteriormente, se desarrollan *off-flavors*, donde uno de los primeros en detectarse es el descriptor a

pasado (*stale*) y con posterioridad se detectan los mismos descriptores de flavor que en los aceites oxidados (ej. rancio, manteca, pintura, etc.), provocando todo ello una disminución de la calidad global del producto. Esto se debe a que durante el almacenamiento se forman compuestos de oxidación secundaria que se caracterizan por ser compuestos de bajo peso molecular originados por descomposición de otros compuestos de oxidación, para los cuáles los sentidos de olfato y gusto humanos presentan una elevada sensibilidad (Stier, 2000).

La evaluación sensorial se puede considerar como una prueba final para evaluar la rancidez oxidativa e hidrolítica de un alimento. No obstante, un inconveniente del análisis sensorial es la exacerbación de esta medida subjetiva debido a la presencia de ciertos aditivos (ej. sal, especias, aromatizantes) que modifican la percepción sensorial global del producto e incluso algunos pueden camuflar flavors no deseados como el rancio en productos fritos (Gillatt, 2001; Bou, 1999).

Consecuentemente con la idea de complementar o sustituir el análisis sensorial, se han ido desarrollando métodos instrumentales (ej. determinación mediante nariz electrónica) que pueden ser correlacionados mediante algoritmos con diferentes métodos analíticos o atributos sensoriales con la idea de dar una percepción del producto frito (Gan y col., 2004; Muhl y col., 2000).

Xu y col. (1999) realizan una comparación entre análisis químicos y la evaluación sensorial mediante una escala hedónica de patatas fritas en 6 aceites diferentes, y ponen de manifiesto una correlación entre la aceptabilidad del color del producto frito y el % CP y el índice de acidez de los aceites de fritura, ($r=-0,665$ y $r=-0,661$, respectivamente).

Numerosos estudios (Melton y col., 1993; Xu y col., 1999; Takeoka y col., 1995; Pangloli y col., 2002), refirieron una estrecha relación entre la puntuación de la cata con los niveles de *off-flavor* ligados a la presencia de concentraciones crecientes de diversos oxialdehídos, pirazinas y compuestos heterocíclicos volátiles. Sin embargo, se han obtenido correlaciones pobres entre la evaluación sensorial y el índice de peróxidos en productos fritos (Frankel, 1998; Jacobsen, 1999; Irwin y col., 2004), posiblemente debido a que los peróxidos lipídicos no son los responsables de la formación del *off-flavor*.

Los productos fritos deben sus características sensoriales básicamente al aceite donde han sido sometidos a fritura y, es por ello, que las fracciones lipídicas extraídas del producto frito son similares en sus características químicas a los del medio de fritura (Masson y col., 2001; Warner y col., 1997; Warner y col., 1994). Asimismo, el proceso de alteración de los alimentos grasos engloba la oxidación de los ácidos grasos insaturados, particularmente de los poliinsaturados, afectando al valor nutritivo del alimento y siendo críticos y esenciales en el desarrollo del flavors desagradables o indeseables (Stier, 2000; Hawrysh y col., 1995; Frankel y col., 1985).

Diversos estudios (Pangloli y col., 2002; Robert y col., 2001; Sharma y col., 1997; Masson y col., 1991) manifiestan la evolución de las puntuaciones organolépticas en distintas condiciones de almacenamiento y estiman la vida útil del producto mediante la relación entre el análisis sensorial y parámetros químicos como el índice de p-anisidina, el contenido de dienos conjugados, el índice de peróxidos, el incremento de ciertos aldehídos (ej. hexanal, 2,4-decadienal) o el % CP.

Por tanto, la evaluación sensorial se puede considerar un gran utensilio para el conocimiento y desarrollo de estos productos fritos y su control de calidad.

II.7. NORMALIZACIÓN DE LOS ACEITES DE FRITURA

II.7.1. Características que deben reunir los aceites y grasas para fritura

Entre los innumerables tipos de aceites y grasas comestibles, sólo un grupo reducido son habitualmente utilizados para la fritura, industrial o doméstica, debido a que reúnen las mejores características para dicho proceso o debido a su menor coste. No obstante, la fritura de cada tipo de producto requiere características diferentes, ya que las características del producto final frito pueden ser variables. En ciertos productos, el consumidor valora positivamente que la superficie y aspecto no sean oleosos, lo que requiere grasas más saturadas, mientras que en otros productos (ej. patatas fritas), muchos consumidores prefieren un producto más impregnado en aceite, que aprecian como más sabroso. No obstante, una propiedad fundamental, directamente ligada con el tipo de aceite o grasa usada, es la estabilidad del producto frito y, por tanto, sus

características de conservación o vida comercial. Ello condicionará también, el tipo de aceite o grasa a utilizar (Gupta y col., 2004).

La cuestión más relevante es que cada tipo de aceite o grasa se obtiene a través de diversos procesos de diferente naturaleza, combinados entre sí (presión, fusión, extracción con disolventes, neutralización, fraccionamiento, cristalización, hidrogenación, decoloración, etc.), lo que influirá también en sus características y estabilidad. La estabilidad frente a la fritura, no sólo depende de la composición en ácidos grasos del aceite o grasa (grado de insaturación, fundamentalmente), sino de la presencia de compuestos de alteración que pueden actuar como prooxidantes, así como de la concentración de algunos componentes minoritarios del insaponificable, o de aditivos, con efecto antioxidante (Brinkmann, 2000; Gupta, 2004; Warner y col., 2004).

En determinados países existe una cierta regulación legal de las características que deben reunir los aceites y grasas destinadas a la fritura, que comprenden desde algunas especificaciones de composición, hasta la utilización de aditivos, pasando por una evaluación de su estado de alteración o de su estabilidad. Además, también se dan normas sobre las temperaturas y tiempos máximos de fritura (Firestone, 2004; Firestone, 1996).

Aditivos: los antiespumantes son utilizados para regular la formación de espuma y también la absorción de aceite por el alimento durante la fritura. Según la normativa europea (DOCE, 1995) el dimetilpolisiloxano (DMSO) se puede utilizar en aceite y grasas de fritura en cantidades inferiores a 10 mg/Kg, al igual sucede en Australia. Otro grupo permitido son los antioxidantes fenólicos que en función del país presentan dosis máximas según el antioxidante y el tipo de aceite, entre los que destacan el BHA, BHT y los galatos.

Composición. En Francia está regulado que los aceites y grasas destinadas a fritura no contengan una cantidad superior al 2% de ácido linolénico. En Hungría, se restringe el uso de aceites altos en linoleico en su tiempo de utilización, como p.ej. 10-13 h para el aceite de maíz o 8-10 h para el aceite de girasol. La Tabla 14 recoge un ejemplo típico de especificaciones que debe reunir un aceite refinado para fritura (Orthofer y Cooper, 1996a).

Tabla 14. Ejemplo típico de especificaciones exigibles para un aceite de soja destinado a la fritura (Orthoefer y Cooper, 1996a).

Parámetro	Valores aceptables	Método AOCS
Color (5 1/4" Lovibond)	1,0 máx.	Cc 13e-92
Acidez libre (% oleico)	0,05 máx.	Ca 5a-40
Índice de peróxidos (meq/Kg)	0,5 máx.	Cd 8-53
Flavor/olor	7 mín.	Cg 1-83
Humedad (%)	0,05 máx.	Ca 2c-25
Aspecto	Claro	
Clorofila (ppb)	75 máx.	
Cold test (h)	10 mín.	
Índice yodo (Wijs)	108-112	Cd 1-25
Ácido linolénico (%)	3,0 máx.	Ce 1-62 (Comp. AG)

Lo más importante para el usuario de aceites y grasas de fritura es exigir unas especificaciones suficientes de calidad para la compra, pero no excesivas, ya que debe respetarse la variabilidad existente en la composición y calidad de un determinado tipo de aceite o grasa, que no tendrá una influencia relevante en el producto final. Unas especificaciones mínimas deben comprender: composición en ácidos grasos, IP, IAn, flavor y color. AOM test y punto de humo son determinaciones complementarias que pueden resultar de interés, mientras la viscosidad es un parámetro de interés cuando se usan grasas semisólidas para la fritura.

II.7.2. Límites para la reutilización de aceites usados en la fritura

Dadas las implicaciones higiénico-sanitarias antes comentadas, los organismos internacionales y la administración de los diferentes países han dictado recomendaciones y disposiciones legales, que regulan la utilización y vida máxima de los aceites y grasas sometidos a fritura (Firestone, 1996; Clark y Serbia, 1991). El sistema más aceptado para el control es el parámetro denominado "porcentaje de compuestos polares totales" (debe ser <24% en Alemania, <25% en España, Bélgica, Chequia, Hungría, Francia e Italia; <27% en Holanda, Suiza y Austria), determinación ya discutida anteriormente.

Actualmente, la legislación española nos indica esta determinación de compuestos polares como método oficial para confirmar la alteración de un aceite sometido a fritura. Sin embargo, según Dobarganes y col. (2000a), este método gravimétrico presenta una reproducibilidad y repetibilidad baja cuando los aceites están poco alterados como es el caso de la fritura en continuo.

La DGF (*Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft*, 2004) recomienda no tan sólo la determinación de compuestos polares sino que añade la determinación de compuestos poliméricos, mucho más simple que la anterior como análisis de referencia para confirmar el abuso de la fritura.

Además, la legislación de algunos países marca también valores límite para otros parámetros complementarios (Tabla 15), como el grado de acidez; la determinación de dímeros y polímeros de los triacilglicerolos, el punto de humo, los AG oxidados insolubles en éter de petróleo, la viscosidad o el índice de carbonilos.

Tabla 15. Valores de diferentes parámetros analíticos que marcan el límite de utilización de grasas y aceites en el proceso de fritura (Stier, 2004; Firestone, 2004).

País	Legislado	% CP	Acidez	Polímeros	Punto humo	AG insolubles en éter	Viscosidad	Test Rápidos	Índice carbonilo	Temperatura fritura (máx.)
Austria	Sí	<27	<2,5	≤ 10	≤ 170	<1				180 °C
Bélgica	Sí	<25	<2,5		≤ 170		<27mPa.s (50 °C)			180 °C
Chile	Sí	<25	<1,0		≤ 170	<1				
Francia	Sí	<25								180 °C
Alemania	Sí	<24			≤ 170	<0,7				170 °C
Hungría	No	<25								180 °C
España	Sí	<25								
Chequia	No	<25		<10		1				
Italia	Sí	<25								180 °C
Japón	No		<2,5		≤ 170				<50	
Holanda	Sí	<27	<4.5	< 16						180 °C
Portugal	Sí	<25								180 °C
Dinamarca	No									
Noruega	No									
Finlandia	No									
Suecia	No				≤ 170					
Suiza	Sí	<27						Fritest		
USA	No	2								

Por otra parte, algunos estudios realizados sobre muestras reales del mercado en Francia (n= 31), España (n= 174) y Alemania (n= 124) (correspondientes a diferentes tipos de establecimientos de fritura y a diversos aceites) ofrecen información interesante para evaluar cuales pueden ser los valores normales de diversos compuestos de alteración que podemos encontrar en los aceites de fritura rechazados. Hay que señalar que todas estas muestras fueron tomadas por los Servicios de Inspección de las administraciones correspondientes. Según estos estudios, los datos que podrían caracterizar un aceite de fritura usado, que ha llegado a valores cercanos al del 25 % de compuestos polares, podrían ser como valores medios: 15,8% de polímeros de los triacilgliceroles; 6,3% de triglicéridos oxidados; 2% de diacilgliceroles y 0,9% de ácidos libres. Finalmente, otra conclusión interesante de los autores de estos trabajos (Al-Kahtani, 1991; Dobarganes y Márquez-Ruiz, 1995) es que en muchos locales (pequeños especialmente) existe un gran desconocimiento del proceso de la fritura, con prácticas incorrectas de recambio o rechazo del aceite, de temperaturas de fritura y preservación del aceite utilizado. Por todo ello, debería también hacerse una campaña en ayuda de muchos de estos establecimientos, para mejorar la calidad de sus procesos y productos, y facilitarles la introducción de medidas simples de control analítico, como los tests rápidos, que permitirían orientarles sobre el estado del aceite en diferentes momentos del proceso.

A partir de datos bibliográficos, Boatella y col., (2002), en un trabajo de revisión, estimaron los valores límite (Tabla 16) que deben cumplir los aceites y grasas sometidas a fritura

Tabla 16. Valores de descarte de los aceites y grasas sometidos a fritura.

Parámetro analítico	Valores límite
% Compuestos polares	< 25-28%
% Polímeros	< 16-18%
% TG oxidados (compuestos no eluibles)	< 6-8%
% AG insolubles en éter de petróleo	< 1-2%
% AG libres	<5%
Viscosidad	< 27 mPa.s (a 50°C)
Constante dieléctrica (<i>FOS method</i>)	< 4
Índice de carbonilos	< 45-55
Índice p-anisidina	< 150-160

En cualquier caso, debe precisarse que los estudios existentes no pueden considerarse suficientes y que algunos de estos valores deberían revisarse después de haberse realizado estudios más detallados en muestras reales procedentes de diferentes sistemas de fritura y cocinado y correspondientes a una mayor diversidad de aceites, lo que permitiría fijar valores más acordes con la realidad.

