



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

# **Elaboración de protocolos para análisis de degradación de aceites vegetales usados**

**Yamid Ortiz Rojas**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Departamento de química  
Bogotá, Colombia  
2012



# **Elaboración de protocolos para análisis de degradación de aceites vegetales**

**Yamid Ortiz Rojas**

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:  
**Especialista en Ciencia y Tecnología de alimentos**

Directora:

Química, M.Sc, Dr, Sc Liliam A. Palomeque Forero

Reutilización de aceites residuales:

Laboratorio de investigación en combustibles y energía

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Departamento de Química  
Bogotá, Colombia

2012



## Resumen

El presente trabajo muestra los resultados del desarrollo de **Procedimientos de Operación Estándar (POE)** para el análisis de compuestos polinucleares y de aldehídos en aceites vegetales sometidos a varios ciclos de fritura en condiciones controladas. La intención es que los análisis puedan ser posteriormente usados en el control de calidad de aceites de fritura a nivel de investigación o a nivel industrial. La necesidad de establecer estos protocolos nace de la inquietud tanto de los consumidores, como de la industria, sobre impacto del reciclaje del aceite de fritura en la calidad y seguridad del producto. Se buscó que los protocolos sean confiables, sencillos y económicos para facilitar su implementación. A pesar de que existen en el mercado paquetes comerciales para el aseguramiento de la calidad del aceite de fritura, los estudios sistemáticos que se han hecho han mostrado dificultades tanto en su aplicación a nivel práctico, como en su repetibilidad y confianza (Bansal & Zhou, 2010).

Se encontró un alto grado de reproducibilidad en los dos protocolos establecidos y se subsanaron errores procedimentales encontrados en desarrollos anteriores dentro del grupo de investigación. Los protocolos tienen como valor agregado, una guía para la interpretación de resultados.

**Palabras clave: aceite de fritura, compuestos polinucleares, p-anisidina, alimentos freídos, oxidación, rancidez**

## **Abstract**

This work shows the results of the development of **Standard Operation Procedures (SOP)** for the analysis of polinuclear compounds and aldehydes en vegetable oils under frying cycles on controlled conditions. The purpose is that the protocols could be used after in the quality control of frying oils in investigation and industry. The requirement of establish these protocols was born of the questions of consumers and industry about the impact of recycling of frying oils in the quality and security of the product. The principal goal was that the protocols will be reliability, simple and economic for its implementation. On despite that exist commercial kits in the market for the assurance of quality of frying oils, the systematic studies have shown difficulties in their application in a practice level, also in their repeatability and reliability (Bansal & Zhou, 2010).

Was encountered high grade of reproducibility in both protocols and was fixed procedural errors found in previous developments inside the investigation group. The protocols have as value added a guide for the interpretation of results.

**Keywords:** frying oil, polinuclear compounds, p-anisidine, fried food, oxidation, rancidity.

# Contenido

	Pág.
<b>Resumen</b> .....	<b>V</b>
<b>Lista de figuras</b> .....	<b>IX</b>
<b>Lista de tablas</b> .....	<b>X</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>1</b>
<b>Planteamiento del problema</b> .....	<b>1</b>
<b>Justificación:</b> .....	<b>1</b>
<b>Objetivos generales y específicos:</b> .....	<b>1</b>
<b>Objetivo general</b> .....	<b>1</b>
<b>Objetivos específicos</b> .....	<b>1</b>
<b>1. Generalidades</b> .....	<b>3</b>
1.1 Revisión del estado del arte.....	3
1.2 Proceso de fritura .....	4
1.3 Procesos de oxidación en los aceites. ....	5
1.4 Generación de compuestos heterocíclicos en el aceite.....	9
1.5 Protocolos de análisis de aceites usados en general.....	10
1.6 Índice de P-anisidina.....	12
<b>1. Metodología</b> .....	<b>13</b>
2.1 Diseño experimental y muestreo.....	13
2.1.1 Diseño experimental .....	13
2.1.2 Muestreo.....	14
2.2 Análisis del aceite de fritura .....	14
2.2.1 Revisión de los protocolos de análisis existentes.....	14
2.2.2 Índice de p-anisidina. ....	14
2.2.3 Protocolo propuesto para cantidad de compuestos polinucleares .....	15
<b>3. Resultados</b> .....	<b>19</b>
<b>4. Análisis de resultados</b> .....	<b>21</b>
4.1 Índice de p-anisidina.....	21
4.2 Cantidad de compuestos polinucleares .....	22

**5. Conclusiones .....25**

**6. Bibliografía .....27**



## Lista de figuras

	<b>Pág.</b>
Ilustración 1. Resumen de reacciones presentes en el proceso de fritura. ....	7
Ilustración 2. Polimerización de dienos para la formación de dímeros.....	8
Ilustración 3. Algunos monómeros de ácidos grasos de ácido linoleico encontrados en el aceite de girasol.....	8
Ilustración 4 Formación de una base de Schiff entre P-anisidina y un compuesto carboxílico.....	12
Ilustración 5 protocolo de análisis de índice de P-anisidina.....	15
Ilustración 6. Protocolo de análisis de cantidad de compuestos polinucleares.....	17
Ilustración 7 Resultados índice de P-anisidina vs ciclos de fritura.....	19
Ilustración 8 Cantidad de compuestos polinucleares longitud de onda vs absorbancia. ..	20

## Lista de tablas

	<b>Pág.</b>
Tabla 1. Análisis básicos usados en grasas y aceites .....	11
Tabla 2. Diseño experimental planteado .....	13





# Introducción

## Planteamiento del problema

Desde el anuncio por parte de la Universidad de Estocolmo y la Administración Nacional de Alimentos de Suecia, de la presencia de elevadas cantidades de acrilamida en los alimentos procesados con tratamientos térmicos, (Rosén J, 2002), rápidamente distintos entes de investigación alrededor del mundo validaron los hallazgos mostrados y el interés de la comunidad científica y del público en general, se volcó en determinar cuáles eran los orígenes y el impacto que este y otros compuestos que se encontraron posteriormente (Masson & Muñoz, 2007).

Tradicionalmente, los análisis hechos sobre aceites y grasas de consumo humano se han hecho con el fin de determinar su calidad e idoneidad para ser usados en la industria alimentaria como materia prima (Mehlenbacher, 1970), pero desde este anuncio, también se comenzó a investigar cómo la calidad de grasas y aceites disminuye a través de procesos de fritura continua y cómo los compuestos que se originan en estos procesos pasan a ser parte de la alimentación por consumo de los alimentos procesados.

En los últimos años se han publicado una gran cantidad de ensayos y artículos sobre protocolos de análisis de aceites de fritura haciendo uso de técnicas analíticas tanto clásicas como modernas; algunos buscan hallar una relación entre la degradación del aceite en los ciclos de fritura con propiedades físico-químicas del mismo (Kalogianni, Karapantsios, & Miller, 2011), (Guillén & Sancho Uriarte, 2012); aunque algunas técnicas clásicas de análisis se han rebatido debido al nuevo conocimiento sobre la dinámica del proceso de fritura (Juárez & Osawa, 2011). Además, se han realizado estudios sobre

cómo afecta el tipo de alimento que se somete a fritura y el tipo de aceite a usar, dando un amplio espectro en el cual se pueden realizar investigaciones (Debnath & Rastogi, 2012), (Konstanta & Igoumenidis, 2011). También se han empleado técnicas analíticas avanzadas para poder identificar y confirmar la presencia de compuestos potencialmente carcinógenos en el aceite de fritura (Giordano, 2011), (Du & Lai, 2012), (Farhoosh, 2011).

Muchos compuestos que han sido hallados en alimentos fritos han sido clasificados, en algún grado, como carcinógenos por la Agencia Internacional de Investigación sobre Cáncer (IARC), como en el caso de la acrilamida (IARC, 1994), y, aunque existen otras fuentes de compuestos clasificados como carcinógenos y otros procesos que los estimulan, las propiedades organolépticas conferidas por los procesos de fritura hacen de especial interés la investigación sobre su relación con la formación de compuestos carcinógenos (Uriarte & Guillén, 2010) (Farhoosh & Hossein, 2010).

## **Justificación:**

Establecer y validar protocolos de análisis a nivel laboratorio permite tener homogeneidad en los datos para poder compararlos entre sí y con respecto a distintos laboratorios de análisis. Las condiciones y equipos disponibles para realizar estos análisis pueden generar cierta variabilidad que se encuentra implícita en cada protocolo, pero se debe asegurar repetibilidad y confianza en los datos obtenidos, así como la mayor sencillez posible en la metodología, un tiempo prudencial para realizar las pruebas y un gasto racional de reactivos, de manera que los datos sean de máxima confianza, sean obtenidos en el menor tiempo posible y los procedimientos sean amigables con el medio ambiente. Así, la mejora continua de los protocolos se encuentra enfocada en la reducción de tiempo de procesamiento e incremento de la exactitud y precisión de los datos obtenidos, lo cual es el principal objetivo de este trabajo.

Se revisarán a fondo algunos de los protocolos propuestos por un trabajo anterior en el grupo de investigación (Marin, 2010) y se probarán a nivel laboratorio. Las muestras a emplear fueron de aceite vegetal sin usar y usado y proceden de tratamientos con condiciones controladas (generadas a nivel laboratorio) y de uso doméstico o industrial. La expectativa que se tiene es lograr la validación de algunos protocolos para análisis de control de calidad con los que se había empezado a trabajar en el grupo de investigación y establecer y validar los protocolos para el análisis de sustancias provenientes de la degradación (índices de p-anisidina y compuestos polinucleares).





## **Objetivos generales y específicos:**

### **Objetivo general**

- Implementar y optimizar algunos protocolos de aseguramiento de calidad de aceites de fritura.

### **Objetivos específicos**

- Desarrollar, realizar el montaje y optimizar protocolos para la determinación de la degradación en aceites de fritura (índice de p-anisidina y polinucleares)
- Analizar el proceso de degradación de un aceite en condiciones controladas.







# 1. Generalidades

## 1.1 Revisión del estado del arte

La humanidad desde la época de la última glaciación ha consumido carne de distintos animales, alces primitivos, cerdos e incluso caballos. Se pasó del consumo de la carne cruda a cocinada con lo cual se mejoró su digestibilidad y primordialmente, sus propiedades organolépticas. Incluso, se agregaron hierbas aromáticas para realzar su sabor. Al ser una comida de gran aceptación se pensó en la posibilidad de usar los residuos que quedaban en los utensilios usados para cocinar otra clase de alimentos, y así nació el uso de la grasa animal para consumo humano. (Toussaint-Samat, 2009).

Por otra parte, el aceite de origen vegetal se conoce y utiliza desde épocas más recientes, encontrándose las primeras referencias al aceite de oliva en tablillas que datan de 5000 años atrás en la región de Babilonia, donde se daba cuenta de este producto como parte de las propiedades del reino de Nebuchadnezzar. Debido a los costos asociados con su producción y extracción, se consideraba (y aún se considera) como un bien suntuoso que solo está reservado para las altas clases sociales y como ofrenda para los dioses. (Toussaint-Samat, 2009).

El hecho de que los aceites vegetales siempre hayan tenido un alto valor asociado a su producción, ha hecho que exista, desde antaño, posibilidad de adulterarlos para aumentar el beneficio económico y el deseo por parte de los compradores de poder comprobar la calidad de los productos. Estas circunstancias dieron origen a las primeras técnicas químicas y físicas para la comprobación de la calidad del aceite.

Con la revolución industrial y la posibilidad de montar grandes procesos de fritura para alimentos de consumo masivo, el uso o no de aceites de fritura usados comenzó a ser un problema industrial. Se busca un balance entre buena calidad organoléptica (dada por aceite fresco) y la disminución de costos de producción (reutilización del aceite).

El proceso de fritura es un proceso intenso donde el aceite es sometido a temperatura y adsorbe humedad y otros compuestos de la sustancia a ser tratada, y todo esto induce a múltiples reacciones químicas que generan un amplio espectro de compuestos químicos (Belitz, 2004). A su vez, el proceso de degradación térmica está afectado por factores como el grado de insaturación del aceite a analizar (Robert, Masson, & Romero, 2001), la clase de alimento a ser procesado, el tiempo de cocción, el número de veces que se reutiliza el aceite y la cantidad de agua que el aceite adsorbe en los procesos de fritura, incluso si el sistema a analizar es una dispersión aceite agua o agua-aceite (McClements, 2000). Además se han estudiado los efectos que pueden tener pretratamientos en el alimento para disminuir la formación de compuestos polinucleares como lavado previo, escaldado, inmersión en soluciones ácidas, así como la reducción de la presión de trabajo (Masson & Muñoz, 2007).

## 1.2 Proceso de fritura

La fritura es un proceso complejo donde se dan de manera simultánea transferencia de masa y calor y un gran número de reacciones (Gupta, 1992). En este proceso, la humedad del alimento pasa a fase vapor y se escapa del alimento a través de su superficie. Esta humedad también toma parte en las reacciones tanto en el aceite como en el alimento. En el alimento los principales cambios son pérdida de humedad, cambio en el color en la superficie de freído, la formación de costra, desarrollo de texturas firmes y desarrollo de sabor y aroma a freído.

A través del proceso de fritura se desarrollan el sabor y el aroma y se generan reacciones de diferentes tipos como: hidrólisis, reacciones autoxidativas, polimerización oxidativa y polimerización térmica. Al mismo tiempo el aceite se torna cada vez más oscuro debido a reacciones de pardeamiento tipo Maillard que se dan en la interfase alimento-aceite.

La calidad del aceite y del alimento frito pasa a través de una fase óptima. Después, la calidad y el sabor de ambos comienzan a declinar (Gupta M., 2005). Las reacciones químicas alteran la estructura química de las moléculas de aceite y los ácidos grasos insaturados son los más afectados.

El aceite provee de algunos atributos importantes al producto que lo hacen agradable al paladar, le dan una buena textura y una sensación y sabor a frito que son apetecidos. Esto se debe a los cambios que se producen tanto en el aceite como en el producto procesado.

En el caso de la fritura doméstica y a nivel de restaurantes, el producto es consumido de manera casi inmediata después del proceso, haciendo que factores como la vida útil del producto sean irrelevantes para el consumidor, pero a nivel industrial, donde para que el producto sea consumido, se deben esperar tiempos de almacenaje y de adquisición, la calidad y estabilidad del aceite son primordiales para asegurar la vida útil del producto.

Debido a que el producto a ser frito gana un importante aumento de masa debido a la absorción del aceite, éste se convierte en uno de los factores determinantes al momento de calcular los costos de producción de un producto frito. Factores como la disponibilidad, costo y un buen manejo por parte del proveedor se tienen que equilibrar con el costo del producto, sus propiedades organolépticas y su vida útil de almacenamiento.

A nivel industrial, el indicador de grado de oxidación del aceite de fritura usado es la cantidad de ácidos grasos libres en el mismo. Un aceite se considera usado cuando el porcentaje de ácidos grasos libres es mayor a 0,5% pero se han hecho ensayos con aceites con un nivel de ácidos grasos libres del 2% y no se vieron afectadas las propiedades organolépticas de los alimentos hasta que se comenzó a oxidar con el aire. Varias técnicas se han implementado en las compañías de productos fritos para identificar y cuantificar el compuesto o compuestos que son los responsables del rechazo del consumidor por sabor, como por ejemplo, protocolos de evaluación de vida útil en el producto, análisis del aceite de fritura tanto en el proceso como el que se encuentra almacenado junto con el producto, análisis sensoriales para determinar en qué punto de fritura el producto ya es rechazado y relaciones estadísticas entre los parámetros de calidad del producto y del aceite entre otros (Badui, 1990).

### **1.3 Procesos de oxidación en los aceites.**

---

Las reacciones involucradas en el proceso de oxidación son variadas y dependientes de las condiciones de fritura, alimento a ser frito y composición de los ácidos grasos del aceite a usar, pero un esquema general se muestra en la ilustración 1.

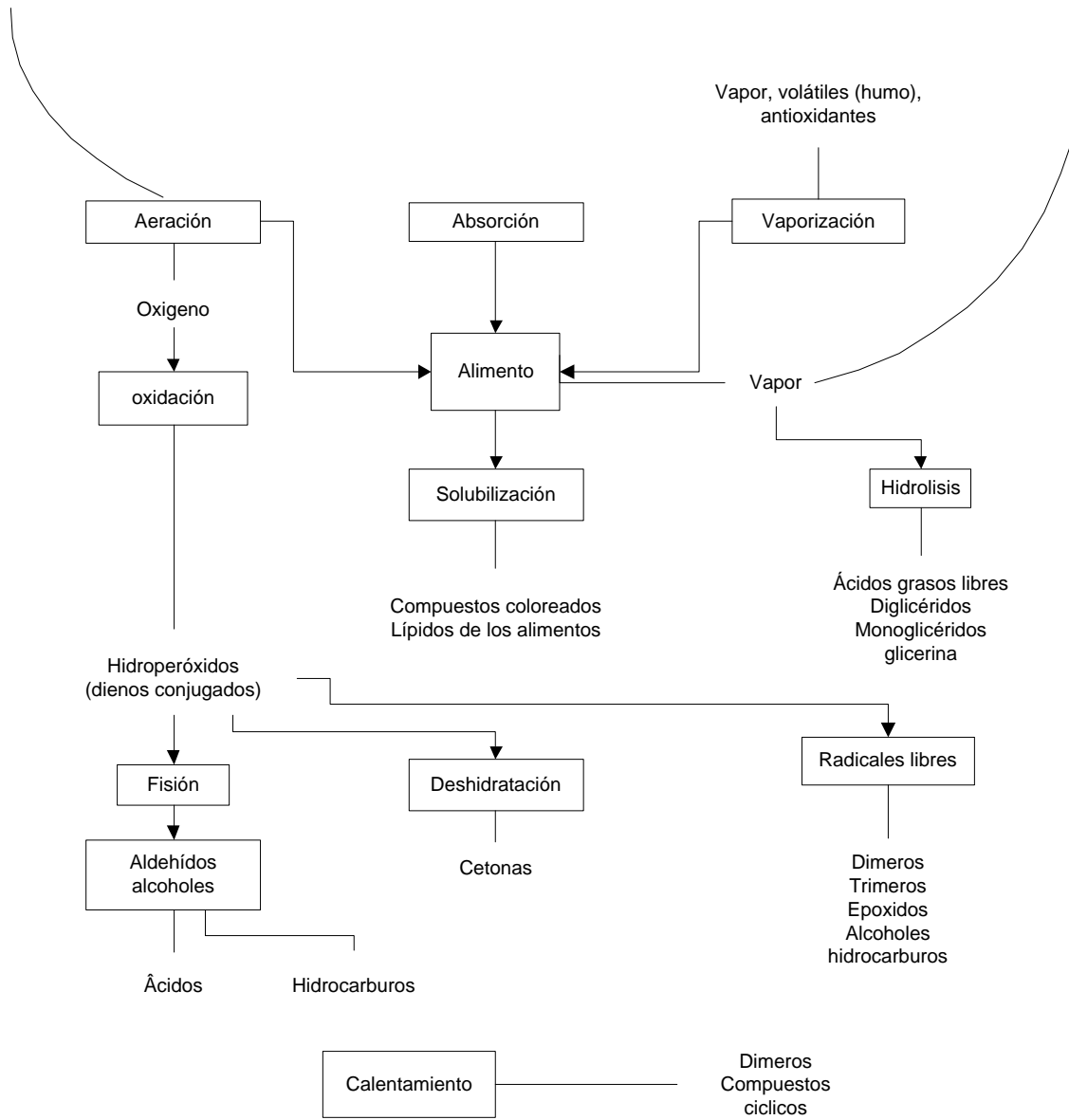
En el proceso de fritura, el vapor de agua que se escapa del alimento y del mismo aceite remueve antioxidantes volátiles, ácidos grasos libres y otros volátiles, al mismo tiempo que conlleva la hidrólisis del aceite con la consecuente producción de ácidos grasos libres y glicerolés parciales. El contacto con el aire conlleva la autooxidación y la formación de un gran número de productos de degradación.

Se ha encontrado que la estabilidad está directamente relacionada con el contenido de ácidos grasos insaturados. A esto se le ha llamado estabilidad inherente (Erickson, 1996), que se calcula con los niveles de cada uno de los ácidos grasos insaturados (oleico, linoleico y linolénico) y su reactividad relativa con el oxígeno; a mayor estabilidad inherente, es menos adecuado para la fritura, así que se tienen que hidrogenar parcialmente para que su desempeño mejore de manera sustancial, como varios estudios lo han demostrado (Robert, Masson, & Romero, 2001).

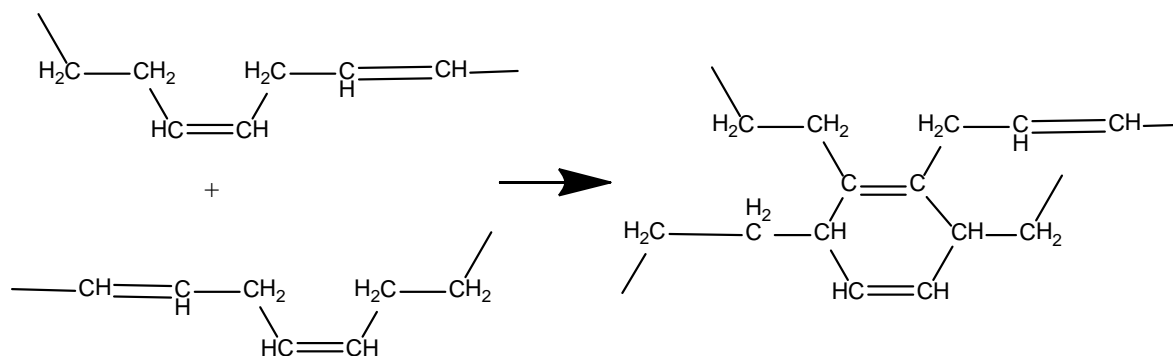
Como se puede observar en el esquema, (ilustración 1), la ruptura del aceite puede ser causada bien por oxidación o por alteración térmica o por ambas al mismo tiempo. Por su parte la oxidación produce triglicéridos oxidados monoméricos, diméricos y oligoméricos así como también compuestos volátiles como cetonas, aldehídos e hidrocarburos entre otros.

La degradación térmica puede formar triglicéridos cíclicos monoméricos y triglicéridos diméricos y oligoméricos no polares. La polimerización puede tomar lugar por la conversión de parte del sistema de dienos de linoleatos *cis-cis-1,4* a un dieno conjugado *trans-trans* (ilustración 2). Los dienos de tipo 1,3 y 1,4 pueden combinarse en una reacción de adición tipo Diels-Alder para producir un dímero; existen también otras posibles rutas de formación de dímeros a través de radicales libres, que pueden involucrar la combinación de radicales y adiciones intramoleculares e intermoleculares. A partir de estos dímeros se pueden generar oligómeros, cuyas estructuras no han sido totalmente estudiadas.



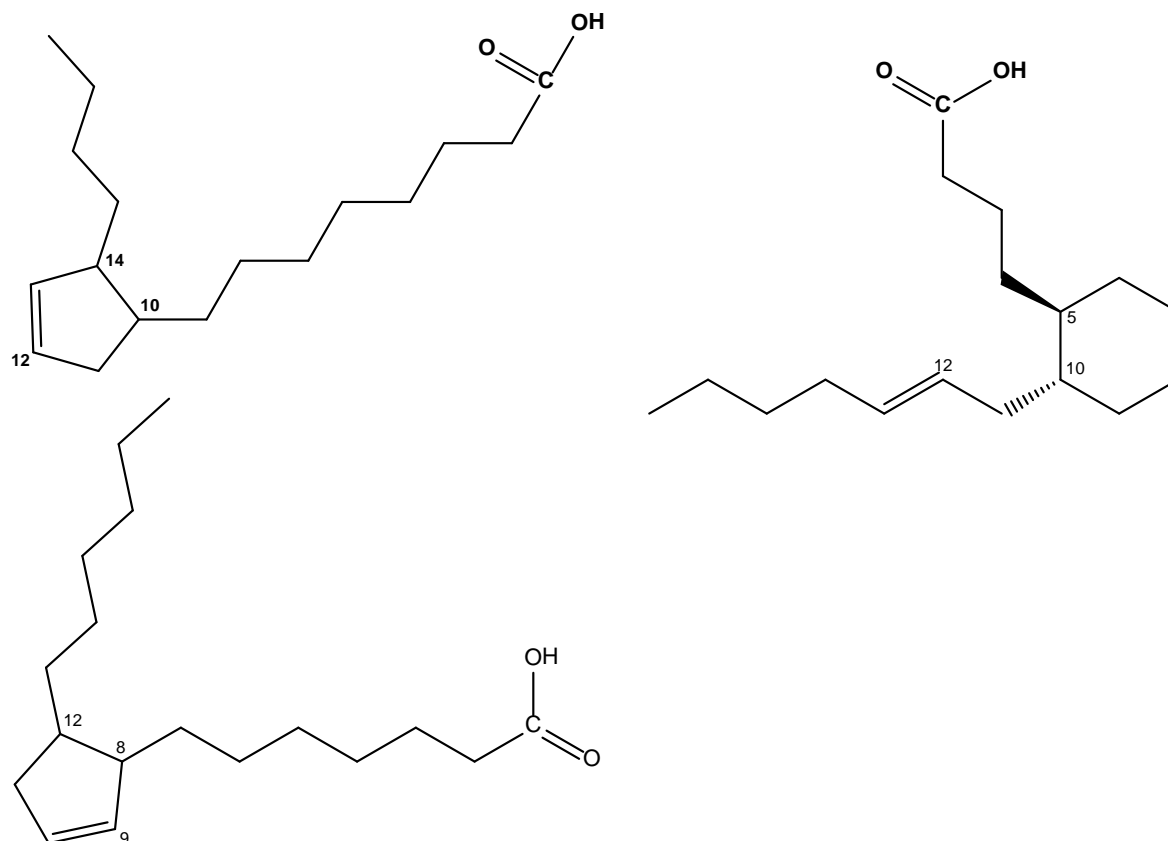


**Ilustración 1. Resumen de reacciones presentes en el proceso de fritura. Adaptado de (deMan, 1999)**



**Ilustración 2. Polimerización de dienos para la formación de dímeros**

Otros compuestos que se pueden formar son los monómeros cíclicos de ácidos grasos. El ácido linoleico puede reaccionar en los dobles enlaces que se encuentran en los carbonos 9 o 12 y generar anillos de tamaños 5 y 9, 5 y 10, 8 y 12, 12 y 17 o 13 y 17 (ilustración 3).



**Ilustración 3. Algunos monómeros de ácidos grasos de ácido linoleico encontrados en el aceite de girasol**

## 1.4 Generación de compuestos heterocíclicos en el aceite.

Como el proceso de fritura se puede identificar como un proceso de deshidratación a través de temperatura y un proceso de pardeamiento a través de reacciones de Maillard en la superficie del alimento, la generación de compuestos heterocíclicos se concentra en estas últimas reacciones. La reacción de Maillard consiste en la reacción de un azúcar reductor y un grupo amino libre que puede provenir de un aminoácido o de una proteína (Badui, 1990). Los compuestos tipo melanoidinas que se producen a través de los complejos procesos que involucran las reacciones de Maillard dependen tanto del azúcar reductor involucrado, como del tipo de compuesto con el grupo amino libre, dando un amplio espectro de compuestos heterocíclicos.

Para la evaluación de potenciales mutagénicos se ha usado el test de *Ames/Salmonella*, se usa para compuestos heterocíclicos amino aromáticos, que contienen de 2 a 5 (generalmente 3) anillos aromáticos condensados en su estructura con un átomo de nitrógeno o más en sus estructuras cíclicas y usualmente un grupo amino exocíclico (Sanz-Alaejos & Alfonso, 2011). Existen dos clasificaciones para estos compuestos, según como se formen, una por la temperatura de generación, que los clasifica en dos grupos: los que se forman en el rango de 100°C a 300°C, que se conocen como heterociclos amino aromáticos “térmicos”, y los que se forman a una temperatura mayor de 300°C que se les nombra como heterociclos amino aromáticos “pirolíticos”. La otra clasificación se da de acuerdo al comportamiento químico con lo que se clasifican como: compuestos polares y no polares.

La detección de estos compuestos en alimentos implica en sí, una tarea difícil, ya que se deben determinar en matrices complejas como son los alimentos procesados. Este problema se resuelve a través de la combinación de procesos elaborados para el pretratamiento de la muestra, unido a procesos de separación selectiva y por último el uso de técnicas analíticas que puedan cuantificar la presencia de estos compuestos a bajos niveles. Todo lo anterior implica un gran costo en materiales y equipos, además de

largos tiempos de procesamiento, lo cual a nivel industrial es una seria barrera para su implementación a nivel práctico.

## **1.5 Protocolos de análisis de aceites usados en general.**

La reactividad de los lípidos se manifiesta tanto en el procesamiento como en el almacenaje de los alimentos, algunas de estas reacciones son deseables, pero otras no (Nielsen, 2010). Para determinar la caracterización de grasas y aceites en el laboratorio se han estandarizado métodos que a nivel internacional son regulados por entidades como AOAC, AOCS y ASTM; a nivel nacional la entidad encargada de regular estos procedimientos y asegurar su idoneidad es ICONTEC.

Estos análisis se les denominarán en el presente proyecto como análisis básicos, para diferenciarlos de los de índice de p-anisidina y compuestos polinucleares, para los cuales desarrollará y establecerá un protocolo y su optimización. Estos análisis básicos nos darán información para poder validar los datos que sean arrojados por los ensayos de índice de p-anisidina y compuestos polinucleares con miras al establecimiento de estos como indicadores directos del grado de degradación de las muestras.

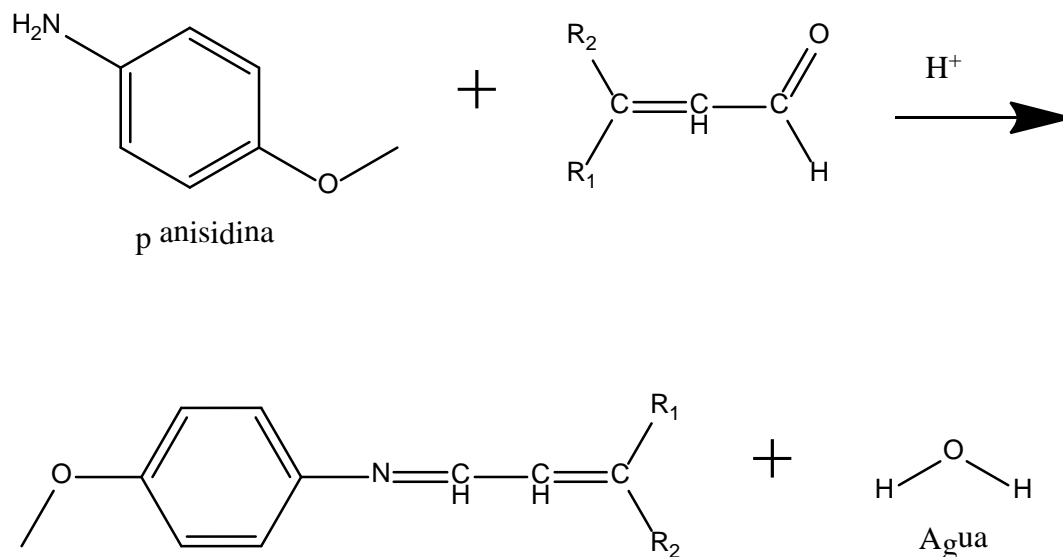
A continuación se presenta una tabla con los análisis básicos a usar y la norma internacional de análisis que se seguirá para cada tipo de ensayo.

**Tabla 1. Análisis básicos usados en grasas y aceites**

Determinación del valor ácido en grasas, aceites y algunos de sus derivados	AOCS Cd 3d-63
Procedimiento para la determinación de cenizas de grasas y aceites	AOCS Ca 11-55
Determinación de la densidad de grasas y aceites	AOCS CC 10C-95
Procedimiento para la determinación del índice de saponificación de aceites y sus derivados	AOCS Cd 3-25
Determinación de agua en aceites combustibles por el método de Karl Fischer	AOCS Ca 2e-84
Determinación de la materia no saponificable en grasas, aceites y algunos de sus derivados	AOCS Ca 6a-40
Procedimiento para la determinación del valor de peróxido por el método de ácido acético-isooctano	AOCS Cd 8b-90
Procedimiento para la determinación del índice de refracción de aceites y grasas	AOCS Cc 7-25
Determinación de la viscosidad de líquidos transparentes	AOCS Ja 11-87
Procedimiento para la determinación del índice de yodo de aceites y grasas animales y vegetales	AOCS Cd 1-25

## 1.6 Índice de P-anisidina

El fundamento de esta prueba consiste en la formación de una base de Schiff de color amarillo, este entre el reactivo y el grupo carbonilo disponible de los compuestos que se han formado en la degradación del aceite o la grasa según la siguiente reacción:



**Ilustración 4** Formación de una base de Schiff entre P-anisidina y un compuesto carboxílico

La estructuras que reaccionan de manera preferible ante la p-anisidina no se han definido del todo, pero al ser evidente que la cantidad de compuestos con grupos carbonilos aumentan a medida que el aceite se deteriora, se infiere que se producirán mas cantidad de estos compuestos, aunque no se puedan comparar debido a que también influye la naturaleza del aceite o grasa de partida. Así, las grasas monoinsaturadas darán una menor respuesta que las ricas en ácido linoleico y éstas a su vez menor respuesta que las ricas en ácido linolénico.

# 1. Metodología

## 2.1 Diseño experimental y muestreo

### 2.1.1 Diseño experimental

El diseño experimental usado fue conformado por el objeto experimental, el cual fue el aceite de fritura, y los tratamientos fueron los ciclos de fritura con croquetas de yuca. Cada ciclo de fritura comprendió el calentamiento del aceite hasta la 180 °C, inmersión de la masa de yuca para freído durante 3 minutos y retiró de la yuca para proceder a realizar el siguiente ciclo con yuca fresca. Se hicieron 15 ciclos de fritura debido a que en ensayos preliminares se observaron cambios de interés después de 5 ciclos de fritura, por lo que se estimo que en 15 ciclos se hará evidente los cambios objeto de este estudio.

Tabla 2. Diseño experimental planteado

	Ciclos de Fritura						
Bloques	1	2	3	.....	13	14	15
aceite							

Cada ensayo arrojo como resultados: a) yuca frita que pasó a ser sometida, por parte de otro experimentador, a análisis de extracto etéreo para determinar la cantidad de aceite que se absorbió en la fritura, y b) aceite usado, del que se extrajo una muestra para realizar los análisis. El resto del aceite se reservo para realizar el siguiente ciclo de fritura con una muestra de yuca fresca. Las condiciones escogidas para realizar la fritura correspondieron a un procedimiento tradicional, domestico y no continuo y no fueron validadas.

Debido a que en cada ciclo de fritura se extrajo cierta cantidad de aceite, la masa de aceite cambio a medida en que los ensayos avanzaron; con el fin de mantener las condiciones de fritura se uso como referencia una relación de masa de yuca/masa de aceite de 1/4, adecuando la masa de yuca a usar según la cantidad de aceite disponible en cada ciclo.

### **2.1.2 Muestreo**

No fue necesario diseñar un método de muestreo para el aceite debido a que fue un factor constante en todos los tratamientos y el volumen a trabajar permitió una fácil homogenización que aseguro la uniformidad de la composición y propiedades en toda la masa de aceite.

La muestra de aceite a extraer en cada ciclo de fritura es de 100 mL de aceite, que luego de ser extraído se guardo en refrigeración en frascos ámbar, para minimizar la velocidad de los procesos químicos de deterioro que se presentan.

## **2.2 Análisis del aceite de fritura**

### **2.2.1 Revisión de los protocolos de análisis existentes**

A cada muestra de aceite tanto a las obtenidas en los ciclos de fritura, como a muestras de aceite fresco, se les realizo pruebas de índice de acidez, ya que este es la prueba que se acostumbra a nivel industrial para la verificación de la calidad de aceites de fritura, además también se realizaron pruebas de constante dieléctrica, ya que esta tiene una buena correlación con el índice de acidez (Navas et al, 2007), lo que permitirá mantener un control cercano a la evolución de la degradación del aceite a través de los ciclos de fritura.

### **2.2.2 Índice de p-anisidina.**

El análisis de índice de p-anisidina seguio el protocolo propuesto que se resume a continuación:



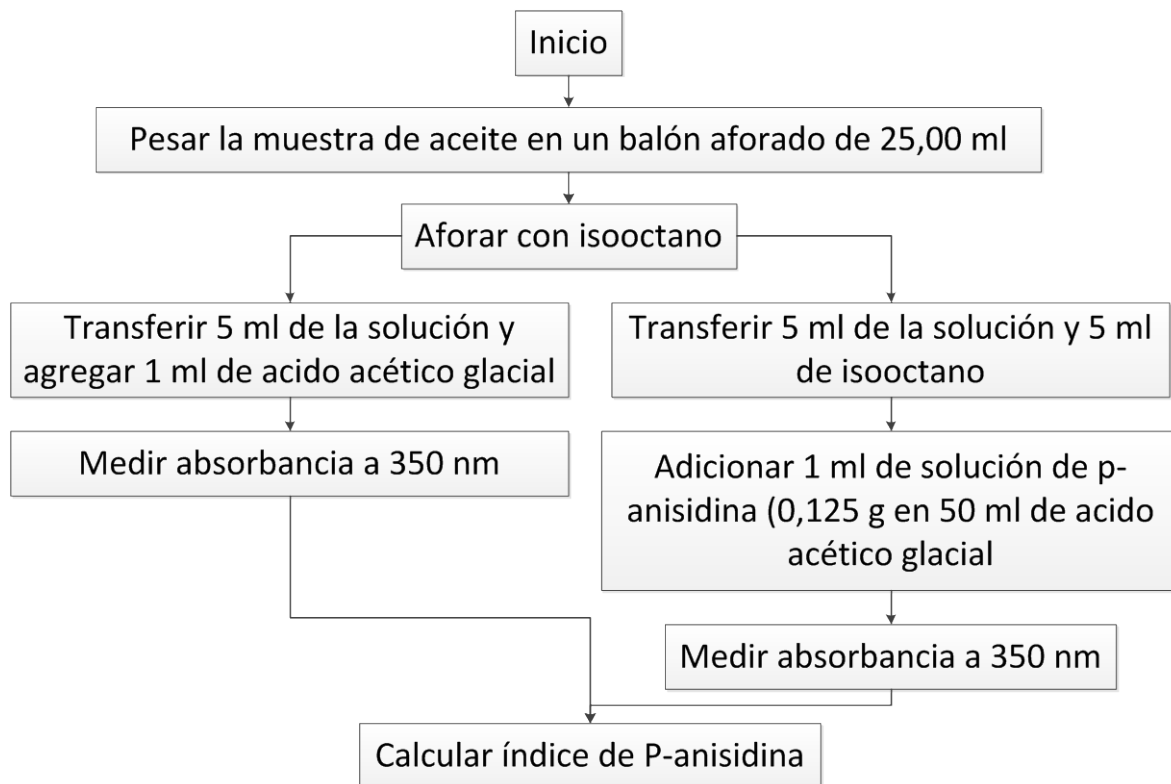


Ilustración 5 protocolo de análisis de índice de P-anisidina

A través de herramientas estadísticas (ANOVA) se determinó si los datos arrojados por cada uno de los ensayos son significativos o pueden ser atribuibles al error experimental, y en este caso se hicieron los respectivos ajustes al protocolo para aumentar el nivel de significancia de los resultados. Era de esperarse que al realizar los ensayos se detecten dificultades en el trabajo experimental y/o elementos a mejorar en el protocolo.

### 2.2.3 Protocolo propuesto para cantidad de compuestos polinucleares

El análisis para determinar la cantidad de compuestos polinucleares se realizó según el protocolo que se muestra en la ilustración n° 5

A través de herramientas estadísticas (ANOVA) se determinó si los datos arrojados por cada uno de los ensayos son significativos o pueden ser atribuibles al error experimental,

y en este caso se hicieron los respectivos ajustes al protocolo para aumentar el nivel de significancia de los resultados.

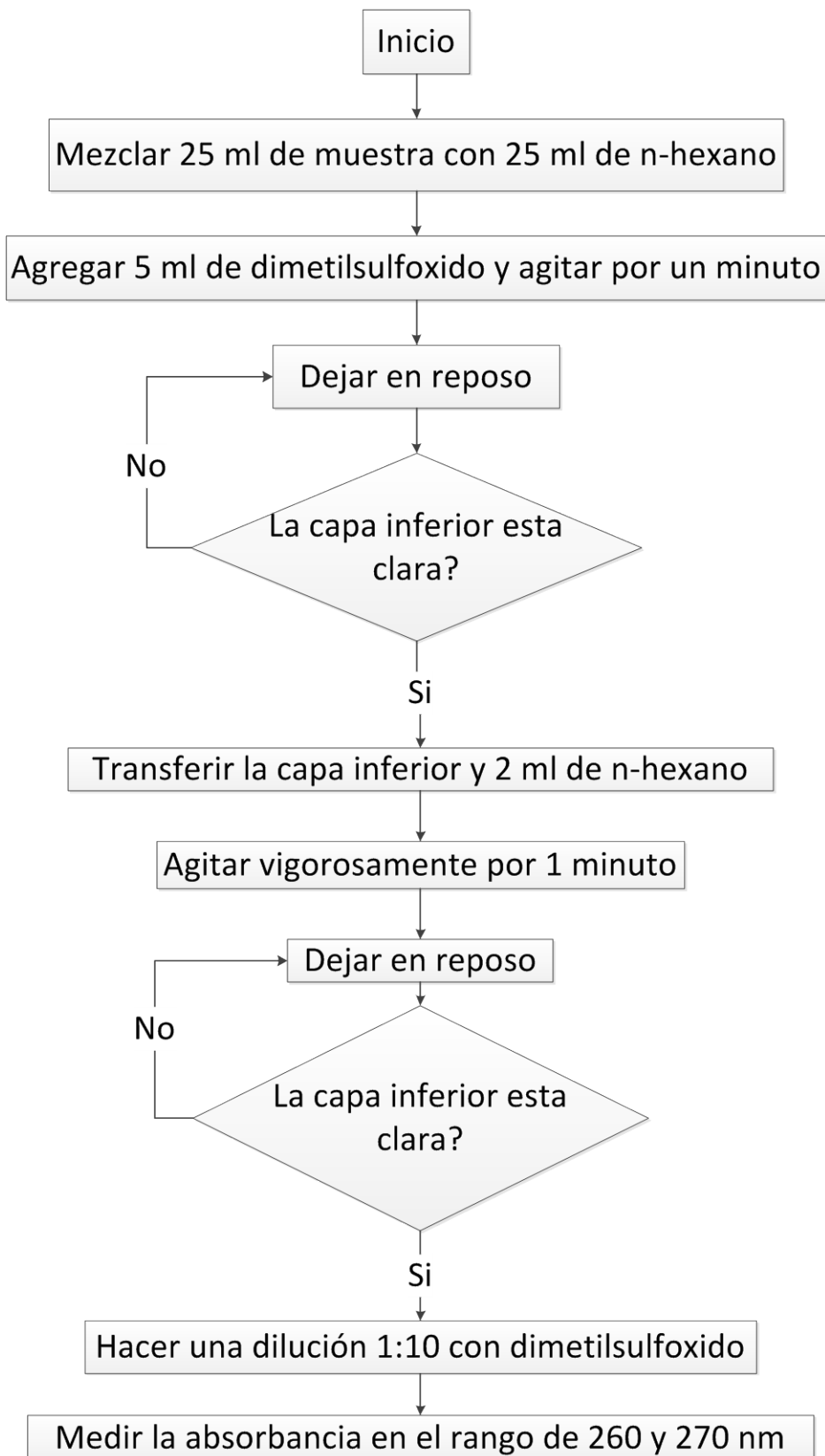


Ilustración 6. Protocolo de análisis de cantidad de compuestos polinucleares



### 3.Resultados

Los resultados obtenidos del análisis de las muestras de aceite de fritura se analizaron estadísticamente usando análisis de varianza y se graficaron para facilitar su posterior análisis. La ilustración n° 7 muestra el comportamiento del índice de p-anisidina según se va avanzando en los ciclos de fritura en cada una de las replicas, representadas por líneas de distinto color

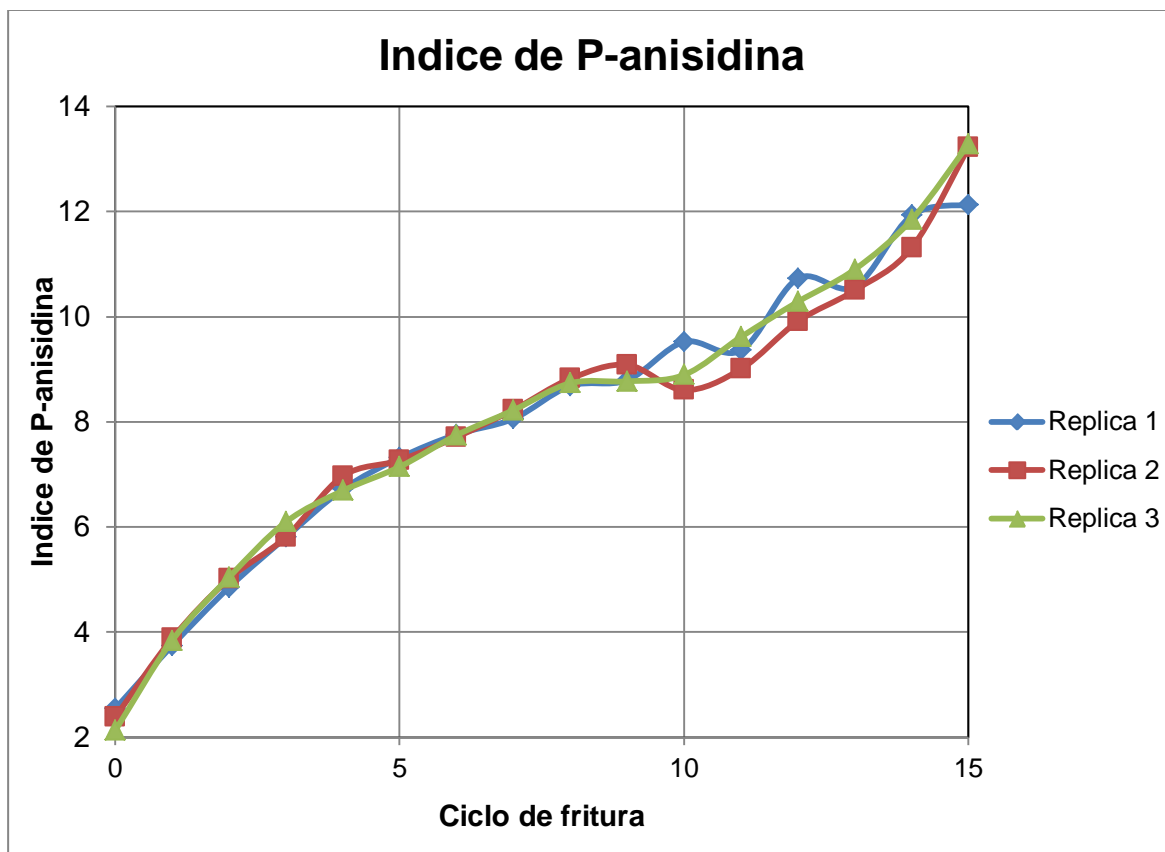
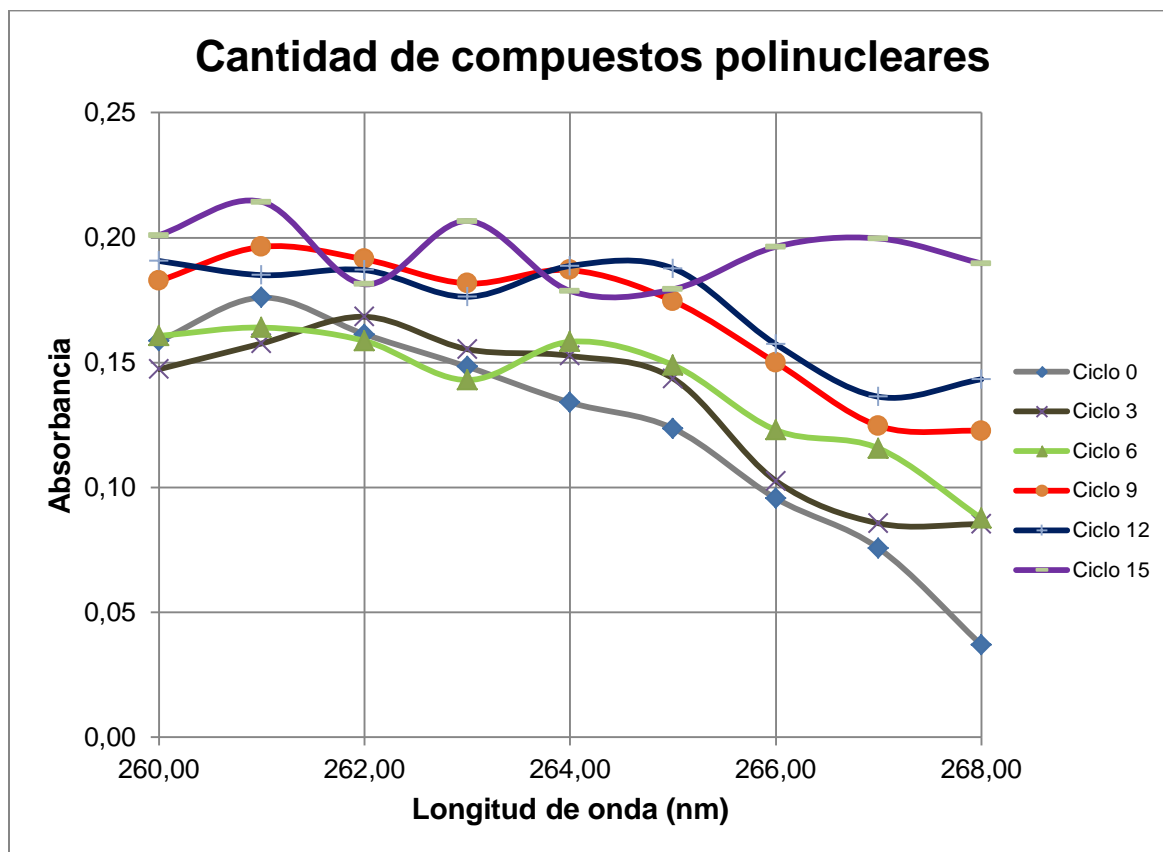


Ilustración 7 Resultados índice de P-anisidina vs ciclos de fritura



**Ilustración 8** Cantidad de compuestos polinucleares longitud de onda vs absorbancia.

La ilustración n°8 muestra el espectro arrojado por las muestras para distintos ciclos de fritura, en este caso se graficó el promedio de las mediciones de los triplicados para cada ciclo y en cada longitud de onda usada y se graficaron solo algunos para facilitar la visualización del grafico y sus tendencias.

## 4. Análisis de resultados

### 4.1 Índice de p-anisidina

En las gráficas se puede observar el grado de reproducibilidad de ambos protocolos, mostrando que ambos son herramientas adecuadas para la identificación y aseguramiento de calidad de aceites de fritura reutilizados. El índice de p-anisidina es más confiable, al proporcionar una medición directa del grado de degradación del aceite; en el gráfico 7 se observa como aumentó el índice a medida que los ciclos avanzaban. Al realizar un análisis estadístico (ANOVA), sobre los datos de índice de p-anisidina, se demostró que para los resultados de las tres réplicas, la varianza era lo suficientemente baja como para considerar que las réplicas provienen de la misma fuente.

En los primeros ciclos de fritura, los resultados eran muy cercanos, prácticamente iguales para las tres alícuotas tomadas del aceite, pero a medida que aumentaban los ciclos la varianza aumentaba, aunque según el análisis ANOVA realizado, esta varianza es atribuible al azar y no es una diferencia significativa. Es necesaria la realización de ensayos con más ciclos de fritura para comprobar si en estados avanzados de oxidación el protocolo pudiese comenzar a presentar una variación mayor a la que se pudiese adjudicar al azar o la tendencia se mantiene.

Esto se puede deber a que la técnica en que se basa el índice de p-anisidina, consiste en la formación de una base de Schiff de color amarillo entre la p-anisidina y el grupo carbonilo de diversos compuestos presentes en el aceite, haciendo que la intensidad del color detectado a 270 nm dependa de la cantidad de compuestos con grupo carbonilo disponibles y esto a su vez dependa del grado de oxidación del mismo y de su origen,

pues los compuestos y su concentración variarían dependiendo del tipo de aceite a analizar, haciendo que en esta prueba se obtengan resultados únicos dependiendo del aceite analizado.

Este último elemento hace necesario que al poner en práctica este protocolo para la medición de calidad del aceite sea necesario bien un análisis anterior sobre el tipo y concentración de ácidos grasos presentes en el aceite y como varían según el lote a usar o dar márgenes para el índice de p-anisidina que subsanen estas variaciones de composición en el aceite a usar. Lo mismo se aplicaría para las mezclas de aceites que se usan en la industria, haciendo que el protocolo tenga que ser comprobado en cada industria y sus valores críticos estimados en cada una de las mismas.

Para poder comprobar la reproducibilidad del método se necesita que se realicen ensayos no solamente intra-laboratorio, sino también inter-laboratorios con distintas muestras de una misma fuente de origen, para mostrar que el protocolo propuesto es reproducible en distintos ambientes y por distintos operadores solo con seguir el protocolo y manteniendo la calidad especificada de los reactivos. A pesar de que los métodos de validación del método incluyen exactitud, precisión, selectividad, límite de cuantificación, linealidad y rango (Morales de la Cruz, 2004), estos métodos de validación tienen que ser evaluados de manera distinta debido a la naturaleza del producto a analizar (un aceite o grasa de origen vegetal que como tal presentara variaciones en la composición y naturaleza de sus componentes o mezclas de los mismos) y sus objetivos adaptados adecuadamente a lo que se requiere del método y lo que este puede brindar.

## **4.2 Cantidad de compuestos polinucleares**

El protocolo de cantidad de compuestos polinucleares también fue capaz de describir el envejecimiento del aceite a través de los ciclos de fritura, como se muestra en el gráfico 8, a medida que el ciclo de fritura era más avanzado, las señales de respuesta en la mayoría de los puntos del espectro analizado fueron mayores y presentaban picos más significativos.



El protocolo contempla el uso de un patrón como referencia para la cantidad de compuestos polinucleares en la muestra, en este caso naftaleno, ya que se considera que esta es la estructura más común en los compuestos que se esperan encontrar en los compuestos polinucleares, pero al realizarse la medición de la absorbancia en el rango especificado, el espectro de respuesta arrojado fue superior al máximo dado por el ciclo 15 de fritura, mostrando que para el caso de aceites de origen vegetal, el naftaleno no es un patrón adecuado, bien sea por su estructura o por la concentración a la cual fue medido, dejando para un futuro trabajo la búsqueda de un patrón mas adecuado y su concentración, según criterios que se pueden formar a través de la literatura que describe muchos de los compuestos que se generan en la degradación de los aceites.

Al realizar este cambio en el patrón de comparación, también es importante revisar el rango de medición de la absorbancia para determinar en que intervalo es mas eficiente o significativa la medición y si se puede asociar los picos que se comienzan a presentar a estados avanzados de degradación a la formación de un o una serie de compuestos específicos, con lo que se puede mejorar en gran medida todos los aspectos necesarios para la validación del protocolo.

Todos estos inconvenientes se dieron a que el protocolo original fue diseñado para la detección de compuestos polinucleares en aceites y parafinas de origen petroquímico, como una medida del grado de presencia de estos compuestos que al ser sometidos a combustión pueden originar compuestos cancerígenos que pueden pasar al ambiente, así que fue diseñado con otras perspectivas, pero se comprobó en este trabajo que también es capaz de detectar estos compuestos polinucleares en aceites vegetales, a pesar que su origen y por lo tanto los compuestos originados van a ser distintos a los que en un principio el protocolo original cuantifica.



## 5. Conclusiones

- Los protocolos propuestos tienen la capacidad de medir indirectamente el grado de degradación de un aceite de fritura sometido a ciclos de fritura hechos de manera manual, casera y no continua.
- El protocolo propuesto para la medición del índice de p-anisidina demostró ser una herramienta eficaz para la medición de degradación del aceite desde los primeros ciclos de fritura.
- Debido a que la naturaleza del aceite o grasa y del producto a procesar influyen en los tipos y cantidad de compuestos que se originan en el proceso, cualquier protocolo que se proponga tiene que ser validado con las características propias de cada proceso (tipo de aceite y mezcla, tipo de producto a freír, tiempo de freído).
- La limitación que tiene el protocolo propuesto para p-anisidina es el costo asociado al reactivo en si mismo, pero este costo se puede justificar en el aumento de la vigilancia en la calidad del aceite empleado en el procesamiento del producto y por lo tanto no seria un gasto sino una inversión que se retribuirá en el reconocimiento de la marca y consolidación de la misma.
- El protocolo propuesto para la medición de la cantidad de compuestos polinucleares en aceites y grasas de fritura mostro su capacidad de medición del grado de degradación, pero es necesario la realización de ajustes para que el protocolo sea aplicable a grasas y aceites de origen vegetal y animal.

- Estos ajustes incluyen la búsqueda y definición de un patrón de comparación y su concentración de trabajo para que los resultados obtenidos sean comparables y medibles.
- Otro ajuste que se puede hacer es confirmar y optimizar el rango de medición de la absorbancia de la muestra, identificando picos característicos que se presentan a grados avanzados de degradación y si estos picos se pueden atribuir a la presencia de una o más sustancias en la muestra, con lo cual los datos arrojados pueden tener un significado a nivel práctico.
- Los protocolos ensayados se ajustaron para que los reactivos y su cantidad fueran representativas para que los resultados fueran correctos sin incurrir en un gasto innecesario de los mismos.

## 6. Bibliografía

- Badui, S. (1990). *Química de los alimentos*. Ciudad de Mexico: Alhambra Mexicana.
- Bansal, G., & Zhou, W. (2010). Evaluation of commercially available rapid test kits for the determination of oil quality in deep-frying operations. *Food Chemistry*, 621–626.
- Belitz, H.-D. G. (2004). *Food chemistry 3er ed.* Berlin: Springer-Verlag.
- Debnath, S., & Rastogi, N. (2012). Effect of frying cycles on physical, chemical and heat transfer quality of rice bran oil during deep-fat frying of poori: An Indian traditional fried food. *Food and Bioproducts Processing*, 249–256.
- Du, R., & Lai, K. (2012). Evaluation of the Quality of Deep Frying Oils with Fourier Transform Near-infrared and Mid-infrared Spectroscopy. *Journal of Food Science*, C261–C266.
- Erickson, D. (1996). Production and composition of frying fats. En M. E. E.G. Perkins, *Deep frying chemistry, nutrition and practical applications* (págs. 4–28). Champaign, Illinois: AOCS press.
- Farhoosh, R. (2011). Simultaneous monitoring of the conventional qualitative indicators during frying of sunflower oil. *Food Chemistry*, 209–213.
- Farhoosh, R., & Hossein, M. (2010). Polar compounds distribution of sunflower oil as affected by unsaponifiable matters of Bene hull oil (BHO) and tertiary-buthydroquinone (TBHQ) during deep-frying. *Food Chemistry*, 381–385.
- Giordano, A. (2011). *evaluation of new thermo-oxidation markers for oils submitted to prolonged and discontinuous frying*. Inedito. Tesis de Doctorado feDOA.
- Guillén, M. D., & Sancho Uriarte, P. (2012). Simultaneous control of the evolution of the percentage in weight of polar compounds, iodine value, acyl groups proportions and aldehydes concentrations in sunflower oil submitted to frying temperature in an industrial fryer. *Food Control*, 50–56.
- Gupta. (1992). proceedings of the world conference of oilseed Technology and utilization. *American Oil Chemists Society Publication.*, (pág. 204). Champaign.
- Gupta, M. (2005). Frying oils. En F. Shahidi, *Bailey's Industrial Oil and Fat Products tomo 4* (pág. 6). John Wiley & Sons, Inc.
- IARC. (1994). Acrylamide. En IARC, *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogen Risk to Humans* (págs. 389 - 433). Lyon, France: IARC press.

- Juárez, M. D., & Osawa, C. C. (2011). Degradation in soybean oil, sunflower oil and partially hydrogenated fats after food frying, monitored by conventional and unconventional methods. *Food Control*, 1920–1927.
- Kalogianni, E. P., Karapantsios, T. D., & Miller, R. (2011). Effect of repeated frying on the viscosity, density and dynamic interfacial tension of palm and olive oil. *Journal of Food Engineering*, 169–179.
- Konstanta, M., & Igoumenidis, P. (2011). Phytosterols in frying oils: evaluation of their absorption in pre-fried potatoes and determination of their destruction kinetics after repeated deep and pan frying. *Procedia Food Science*, 608–615.
- Marin, P. (2010). Establecimiento de protocolos para la caracterización de aceites empleados como materia prima en la obtención de aceites combustibles.
- Masson, L., & Muñoz, J. (2007). Acrilamida en patatas fritas: revisión actualizada. *Grasas y aceites* 58 (2), 185 - 193.
- McClements, D. (2000). Lipid oxidation in oil-in-water emulsions: impact of molecular environment on chemical reactions in heterogeneous food systems. *Journal of Food Science*, 1270 - 1282.
- Mehlenbacher, V. (1970). *Análisis de grasas y aceites*. Bilbao: Ediciones URMO.
- Morales de la Cruz, C. (2004). *Desarrollo y Validación Prospectiva de una Técnica Analítica por Cromatografía Líquida de alta Performance (HPLC) para el Enalapril 10 mg tabletas recubiertas*. Lima: Universidad nacional Mayor de San Marcos.
- Navas et al, J. A. (2007). Optimization of analytical methods for the assessment of the quality of fats and oils used in continuous deep fat frying. *Grasas y aceites*, 58 (2), 148 - 153.
- Nielsen, S. (2010). *Food analysis laboratory manual*. New York: Springer.
- Robert, P., Masson, L., & Romero, N. (2001). Fritura industrial de patatas críps. Influencia del grado de insaturación de la grasa de fritura sobre la estabilidad oxidativa durante el almacenamiento. *Grasas y Aceites Vol 52 Fasc 6*, 389-396.
- Rosén J, H. K. (2002). Analysis of acrylamide in cooked foods by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analyst*, 880 - 882.
- Sanz-Alaejos, M., & Alfonso, A. M. (2011). Factors that affect the Content of Heterocyclic Aromatic Amines in Foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 52 - 108.
- Toussaint-Samat, M. (2009). *A history of food*. Wiley-Blackwell.

---

Uriarte, P. S., & Guillén, M. D. (2010). Formation of toxic alkylbenzenes in edible oils submitted to frying temperature: Influence of oil composition in main components and heating time. *Food Research International*, 2161–2170.