

**EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD OXIDATIVA DE GRASAS
INTERESTERIFICADAS ENZIMÁTICAMENTE**

JOHANNA ANDREA CASTILLO CORREA

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2007**

**EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD OXIDATIVA DE GRASAS
INTERESTERIFICADAS ENZIMÁTICAMENTE**

JOHANNA ANDREA CASTILLO CORREA

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar
al título de: Química**

**Directora: Prof. JANETH AIDÉ PEREA VILLAMIL
Química, M. Sc. Doctora en Química**

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS
CICTA**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2007**

*A mi padre: Jaime Castillo, orientador y
compañero de camino.*

*A mi madre: Ana Victoria Correa, que
aunque no este conmigo, siempre es y será
la inspiración en cada uno de mis logros.*

*A toda mi familia y amigos, que me brindaron
su apoyo, comprensión
y cariño cuando más lo necesité.*

JOHANNA ANDREA

AGRADECIMIENTOS

A la doctora Aidé Perea, por su confianza, apoyo y orientación en este proyecto.

A los calificadores, doctora Elena Stashenko, profesor Rodrigo Torres, por su tiempo y atención.

A mis compañeros y amigos del CICTA (Luis Carlos, Fabian, Sindy, Erick, Gloria, Jennifer, Olga, Arley, Tatiana, Jenny, Yamile y Cora.

A María Antonia Amado y Nelson Moreno, por la colaboración con el suministro de los aceites y los análisis realizados en SACEITES.

A los profesores y compañeros que me apoyaron y colaboraron durante toda mi carrera.

Y demás personas que de una u otra forma hicieron posible este trabajo.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	16
1. MARCO TEÓRICO – ESTADO DEL ARTE	19
1.1 GRASAS ESPECIALES	22
1.1.1 Producción de Grasas Especiales	23
1.1.2 Tipos de Grasas Especiales	30
1.2 PRINCIPALES ALTERACIONES QUE AFECTAN LAS GRASAS	33
1.2.1 Lipólisis o enranciamiento hidrolítico	35
1.2.2 Autooxidación o enranciamiento oxidativo	35
1.3 MÉTODOS EMPLEADOS PARA DETERMINAR LA OXIDACIÓN EN LAS GRASAS	41
2. METODOLOGIA	52
2.1. MATERIALES Y REACTIVOS	52
2.2 DESARROLLO EXPERIMENTAL	53
2.2.1 Pretratamiento general de la enzima	53
2.2.2 Reacción de interesterificación enzimática	54
2.2.3 Evaluación de la estabilidad oxidativa	54
2.3. METODOS DE ANALISIS	56
2.3.1 Análisis de Ácidos Grasos	56
2.3.2 Índice de Peróxidos	57
2.3.3 Índice de <i>p</i> – Anisidina	58
2.3.4 Índice de Acidez:	59
2.3.5 Índice de Yodo	60
2.3.6 Coeficiente de extinción específica a 269 nm ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$)	61

2.3.7 Determinación del período de inducción	61
2.3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	62
3. ANÁLISIS DE RESULTADOS	63
3.1 COMPOSICIÓN RELATIVA DE ÁCIDOS GRASOS	63
3.2 ÍNDICE DE PERÓXIDO	68
3.3. ÍNDICE DE <i>p</i> -ANISIDINA	73
3.4 COEFICIENTE DE EXTINCIÓN ESPECÍFICA ($E^{1\%}_{1\text{cm}}$ a 269nm)	77
3.5 ÍNDICE DE YODO	79
3.6 ÍNDICE DE ACIDEZ	80
3.7 DETERMINACIÓN DEL PERÍODO DE INDUCCIÓN POR EL	82
CONCLUSIONES	87
BIBLIOGRAFÍA	89
ANEXOS	98

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Composición de ácidos grasos de aceites vegetales	24
Tabla 2. Composición de ácidos Grasos de las materias primas utilizadas ^a	65
Tabla 3. Composición de ácidos Grasos después de la reacción de Interesterificación enzimática ^a	66
Tabla 4. Índices de Peróxidos (meq O ₂ /k grasa) de las grasas Interesterificadas enzimáticamente.	70
Tabla 5. Índices de <i>p</i> -anisidina (mg/k grasa) de las grasas interesterificadas enzimáticamente	76
Tabla 6. Cambios en la extinción específica, $E^{1\%}_{1\text{ cm}}$ a 269 nm en la reacción de Interesterificación	78
Tabla 7. Índices de yodo de las materias primas utilizadas y de las grasas ininteresterificadas enzimáticamente	80
Tabla 8. Tiempo de Inducción determinado por el rancimat	82

LISTA DE ESQUEMAS

	Pág.
Esquema 1. Fórmula estructural de una molécula típica de triacilglicérido y sus	20
Esquema 2. Proceso de hidrogenación	26
Esquema 3. Procedimiento enzimático para obtener lípidos estructurados	30
Esquema 4. Mecanismo de oxidación del ácido linoleico con oxígeno triplete	38
Esquema 5. Abstracción de hidrógeno de un carbono alílico en la oxidación de un radical libre de un ácido graso	39
Esquema 6. Determinación de los hidroperóxidos lipídicos	42
Esquema 7. Reacción de los compuestos aldehídicos con el reactivo <i>p</i> -anisidina	44
Esquema 8. Reacciones de titulación del yodo con tiosulfato	47

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Estados de la oxidación lipídico	46
Figura 2. Tiempo de Inducción determinado por el rancimat	51
Figura 3. Montaje empleado para monitorear la reacción de Interesterificación enzimática	55
Figura 4. Vista equipo rancimat 679	61
Figura 5. Variación del índice de Peróxidos con el tiempo de reacción en la	71
Figura 6. Variación del índice de <i>p</i> -Anisidina en la reacción de	74
Figura 7. Variación del índice de acidez en la reacción de interesterificación enzimática con el tiempo de reacción	81
Figura 8. Curvas experimentales obtenidas en el periodo de inducción	83

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Perfil cromatográfico del sistema Estearina de Palma – Aceite de Soya antes de la Interesterificación enzimática.	99
Anexo B. Perfil cromatográfico del sistema Estearina de Palma – Aceite de Soya después de la Interesterificación enzimática.	100
Anexo C. Perfil cromatográfico del sistema Superestearina de Palma – Aceite de Palmiste antes de la Interesterificación enzimática.	101
Anexo D. Perfil cromatográfico del sistema Superestearina de Palma – Aceite de Palmiste después de la Interesterificación enzimática	102
Anexo E. Perfil cromatográfico del sistema Estearina de Palma – Aceite de Soya – Aceite de Palmiste antes de la Interesterificación enzimática	103
Anexo F. Perfil cromatográfico del sistema Estearina de Palma – Aceite de Soya – Aceite de Palmiste después de la Interesterificación enzimática	104

LISTA DE ABREVIATURAS

AOAC:	<i>Association of Official Analytical Chemists</i> (Asociación Oficial de Químicos Analíticos)
AGPI:	Ácidos grasos poliinsaturados
AV:	<i>p-Anisidine value</i> (Valor de p-Anisidina)
CICTA:	Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos
CG:	<i>Gas Chromatography</i> (Cromatografía de gases)
CH₂:	Hidrógeno metilénico
CLA:	Ácido linoleico conjugado
CV:	Coefficiente de varianza
°C:	Grados centígrados
DAG:	Diglicéridos
DOBI:	Índice de deterioro de la blanqueabilidad
FAME's:	<i>Fatty Acid Methyl Esters</i> (Ésteres Metílicos de ácidos grasos)
FFA:	Ácidos grasos libres
FID:	<i>Flame Ionization Detector</i> (Detector de Ionización en llama)
IA:	Índice de acidez
KI:	Yoduro de potasio
KOH:	Hidróxido de potasio
KPa:	Kilo pascales
MAG:	Monoglicérido
Nm:	Nanómetros
2Na₂S₂O₃:	Tiosulfato de sodio
¹O₂:	Oxígeno Singulete
³O₂:	Oxígeno Triplete
OMEGA-GOLD:	Aceite comercial derivado de la microalga <i>Schizochytrium</i> sp.
PM:	Peso molecular

PV:	<i>Peroxide value</i> (Valor de peróxido)
SL:	Lípidos estructurados
α:	Alfa
β:	Beta
δ:	Gama
ρ:	Delta
\bar{x}:	Promedio
σ:	Desviación estándar

RESUMEN

TÍTULO: EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD OXIDATIVA DE GRASAS INTERESTERIFICADAS ENZIMÁTICAMENTE*

AUTOR: Castillo Correa, Johanna Andrea**

PALABRAS CLAVES: Interesterificación enzimática, estabilidad oxidativa, ácidos grasos insaturados.

DESCRIPCIÓN:

La estabilidad oxidativa es una prueba predictiva que evalúa la resistencia de las grasas y los aceites a reacciones de oxidación y da indicación de su vida de anaquel, dependiendo de las condiciones de manejo, almacenamiento y procesamiento.

En este trabajo se evaluó la estabilidad oxidativa a lo largo de la reacción de interesterificación enzimática catalizada por la lipasa inmovilizada de *Thermomyces lanuginosa* (Lipozyme TL, IM) de un *shortenings* (estearina de palma-aceite de soya), un equivalente de la manteca de cacao (superestearina de palma-aceite de palmiste) y un lípido estructurado (estearina de palma-aceite de soya-aceite de palmiste). Las muestras obtenidas fueron analizadas por el índice de peróxido (PV), índice de *p*-anisidina (AV), índice de acidez (IA), índice de yodo, composición relativa de ácidos grasos, extinción específica $E^{1\%}_{1\text{cm}}$ a 263 nm y el ensayo rancimat.

Se encontró que el lípido estructurado tenía mayores cambios en los valores de PV, AV, IA, $E^{1\%}_{1\text{cm}}$ a 263 nm con respecto a los demás sistemas analizados durante la interesterificación y además presentó el menor tiempo de inducción, determinado por el rancimat, el cual disminuyó de 20.0 a 8.82 horas a 110 °C después de la modificación, indicando que esta mezcla de reacción fue más susceptible de la deterioración oxidativa durante la interesterificación enzimática; básicamente debido a la mayor concentración de ácido linolénico (1.13%). El sistema con mayor estabilidad oxidativa fue el *shortenings*, debido a su alto contenido de ácidos grasos saturados al inicio de la reacción.

* Trabajo de grado

** Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ciencias. Escuela de Ciencias. Janeth Aidé Perea Villamil

ABSTRAC

TITLE: EVALUATION OF THE OXIDATIVE STABILITY OF FATTY PRODUCED BY LIPASE-CATALYZED INTERESTERIFICATION*

AUTHOR: Castillo Correa, Johanna Andrea**

KEYWORDS: Interesterification, oxidative stability, unsaturated fatty acid.

DESCRIPTION:

The oxidative stability is an important indicator of performance and shelf-life, and depends on the composition of the sample and on the conditions to which it is subjected.

In this work, it was evaluated oxidative stability monitored periodically the reaction of enzymatic-catalyzed interesterificación by the immobilized lipase from *Thermomyces lanuginosa* (Lipozyme TL, IM) of a *shortenings* (palm stearin-soybean oil), an equivalent of the cocoa (palm superestearin –palm kernel olein) and a structured lipid (palm stearin-soybean oil- palm kernel olein). The obtained samples were analyzed by the peroxide value (PV), *p*-anisidina value (AV), free fatty acid (FFA), value iodine, and relative composition of fatty acids, specific extinction $E^{1\%}_{1\text{cm}}$ at 263 nm and the test rancimat.

The structured lipid blend was found to have higher changes PV, AV, IA, $E^{1\%}_{1\text{cm}}$ at 263 nm values, compared to the other analyzed systems and induction time, determined by the rancimat method, decreased from 20.0 to 8.82 hours to 110 °C after the modification, indicating that this reaction mixture was more susceptible to oxidative deterioration during the enzymatic interesterification; basically due to its high linolénico fatty acid (1.13%) levels. *The shortenings* presented better oxidative stability, due to its high content of saturated fatty acids to the beginning of the reaction.

* Project of Grade

** Industrial University of Santander Faculty of Sciences. School of Chemistry. Janeth Aidé Perea Villamil

INTRODUCCIÓN

Desde hace tiempo se conocen las cualidades nutricionales de muchos ácidos grasos y otros componentes que se encuentran de manera natural en los aceites vegetales, lo que ha motivado la producción de grasas especiales, mediante interesterificación enzimática; proceso que permite la síntesis de triacilglicéridos con una composición específica de ácidos grasos; con el fin de obtener productos con características físicas y químicas adecuadas para la industria de alimentos y en algunos casos para incrementar su utilización desde el punto de vista nutricional y terapéutico [Lee J. *et al.*, 2004].

Teniendo en cuenta que las grasas interesterificadas pueden ser incorporadas en la alimentación como grasas bases para la preparación de “*shortenings*”, margarinas y lípidos estructurados, se hace necesario, no sólo optimizar las propiedades nutricionales y físicas del producto, sino además asegurar que la estabilidad oxidativa del mismo, sea comparable a la de los aceites vegetales de quienes proceden. Por consiguiente, es importante el control de las grasas y los aceites modificados principalmente aquellos susceptibles a reacciones de deterioro, que traen consigo una pérdida de la calidad, de las propiedades sensoriales y nutricionales, de seguridad biológica (desarrollo de patógenos) y de vida útil (alteraciones) del producto final.

La estabilidad oxidativa, es una prueba predictiva que evalúa la resistencia de las grasas y los aceites a reacciones de oxidación y da indicación de su vida de anaquel, al proporcionar una buena estimación, no sólo de la estabilidad oxidativa inicial de los mismos, sino además de la estabilidad oxidativa futura, dependiendo de las condiciones de manejo, almacenamiento y procesamiento.

Dentro de las principales reacciones de deterioro observadas en las grasas y los aceites se encuentran: la rancidez hidrolítica y la rancidez oxidativa, las cuales producen una gama de productos, que incluyen compuestos como aldehídos, cetonas, ácidos grasos de cadena corta y otra serie de compuestos carbonílicos que pueden llegar a reaccionar con otros componentes de los alimentos o dar origen a compuestos responsables del mal olor y sabor de los mismos [Hotchkiss P., 1997].

Para evaluar la rancidez oxidativa se han usado una serie de métodos que permiten analizar diversos intermediarios o productos de la oxidación, entre los que se encuentran principalmente los métodos químicos clásicos como el índice de peróxido, índice de yodo, índice de *p*-anisidina y el índice de acidez [Ortega M. *et al.*, 2001, Guillen M. y Cabo N., 2001]; métodos físicos como la cromatografía de gases para determinar la composición de los ácidos grasos presentes, antes y después de someter la grasa a condiciones de deterioro. Igualmente, la determinación del contenido de productos secundarios de oxidación concretos, como aldehídos volátiles, son buenos indicadores del grado de oxidación de las grasas [Guillén M. y Cabo N., 2002, Rodríguez R., 2005].

En muchos casos se han desarrollado técnicas que buscan acelerar las condiciones de oxidación (aumento de la temperatura en presencia de oxígeno y aire en exceso) como es el caso del método rancimat [Velasco J. *et al.*, 2004].

Aunque numerosos artículos reportados, evalúan el desempeño de diferentes grasas producidas por interesterificación enzimática, empleadas como sustitutos de alimentos o como grasas para fritura, en condiciones de deterioro [Moussata C. y Casimir A., 1998, Chu B. *et al.*, 2001, Lee J. *et al.*, 2004, Heinrich M. *et al.*, 2004, Hamah F. y Fereidoon S., 2005, Nielsen N. *et al.*, 2006, Lee J. *et al.*, 2006, Turan S. *et al.*, 2007]; son limitados los estudios sobre el efecto de la reacción enzimática, en la estabilidad oxidativa de las grasas obtenidas.

Basado en lo anterior, el objetivo de este trabajo es evaluar la estabilidad oxidativa de dichas grasas a lo largo de la reacción de interesterificación enzimática y durante el almacenamiento, con el fin de contribuir al mejoramiento de las mismas durante su elaboración.

Para llevar a cabo el desarrollo de la investigación se realizó un monitoreo periódico en la reacción de interesterificación enzimática de tres grasas bases para la fabricación de *shortenings* (Estearina de Palma – Aceite de Soya), equivalentes de la manteca de cacao (Superestearina de Palma - Aceite de Palmiste) y lípidos estructurados: (Estearina de Palma – Aceite de Soya – Aceite de Palmiste), catalizadas por la lipasa inmovilizada de *Thermomyces lanuginosa* (Lipozyme TL, IM).

Para evaluar la estabilidad de los sistemas grasos interesterificados se midieron los parámetros físico-químicos mencionados anteriormente: índice de peróxidos, de *p*-anisidina, de yodo y de acidez, la determinación de ácidos grasos, el coeficiente de extinción $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ a 269 nm y la aplicación del método rancimat.

El presente proyecto hace parte de la línea de investigación que se desarrolla en el CICTA respecto al aprovechamiento del aceite de palma y sus fracciones.

El documento presentado está constituido de 4 capítulos, el primero de ellos basado en la revisión bibliográfica sobre el tema de investigación. El segundo, presenta el desarrollo experimental que se llevó a cabo para lograr los objetivos propuestos. El tercer capítulo, presenta los resultados obtenidos y su respectiva comparación con los resultados de otras investigaciones y por último, se presentan las conclusiones.

1. MARCO TEÓRICO – ESTADO DEL ARTE

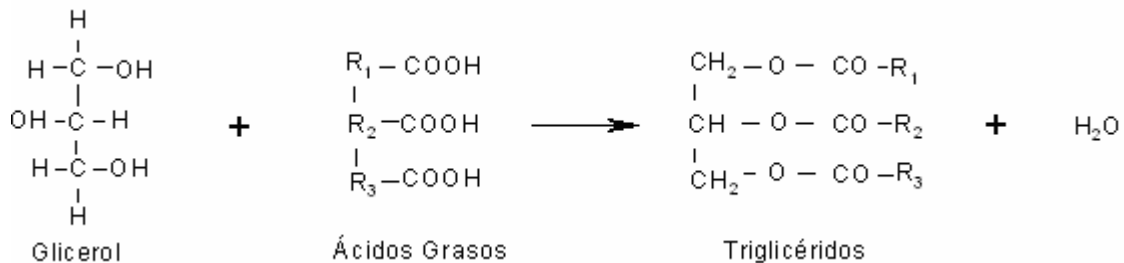
La palabra “grasas” hace referencia al grupo de alimentos lipídicos, provenientes de tejidos vegetales y animales que diariamente se ingieren en la dieta.

Los lípidos son una fuente energética muy importante para el organismo (cada gramo genera 9 Kcal), mucho de ellos cumplen una actividad biológica; por ejemplo, unos son parte estructural de las membranas celulares y de los sistemas de transporte de diversos nutrientes, otros son vitaminas y hormonas y algunos son pigmentos.

En los alimentos, los lípidos contribuyen a la textura y en general a las propiedades sensoriales del producto. Las principales fuentes son los tejidos animales y las semillas oleaginosas, ya que las frutas y las hortalizas presentan muy bajas concentraciones, con algunas excepciones como el aguacate, las aceitunas y algunos tipos de nueces [Badui S., 1996].

Las grasas y los aceites están formados principalmente por triacilglicéridos (**Esquema 1**), que contribuyen en un 93-95% del total de lípidos ingeridos en la dieta. Una molécula de triacilgliéridos es el producto de la interesterificación entre el polialcohol glicerol con tres ácidos grasos [Valenzuela J. *et al.*, 2002], que pueden variar en la longitud de la cadena de C2 a C24 y de ácidos grasos saturados a ácidos grasos insaturados con seis enlaces dobles [Mu H. y Trine P., 2005].

Esquema 1. Fórmula estructural de una molécula típica de triacilglicérido y sus componentes



R representa cualquier ácido graso

El tipo de ácido graso y sus características (tamaño de cadena, grado de insaturación, isomería, entre otras) y la posición en la cual se esterifica a glicerol determinan las características de los triacilglicéridos [Kairuz L., 2002]. Actualmente, los esfuerzos tecnológicos están orientados al desarrollo de nuevos lípidos con diferentes propiedades funcionales y diferentes aplicaciones industriales.

Además de los triacilglicéridos, existen en las grasas componentes no glicéridos de los ácidos grasos, denominados algunas veces “constituyentes menores”, los cuales pueden contribuir en la estabilidad oxidativa de las mismas.

Los componentes no glicéridos sólo son componentes menores en lo que se refiere a su concentración con respecto a los triacilglicéridos [FAO., 1997], están compuestos principalmente de fosfolípidos, tocoferoles, tocotrienoles, flavonoides y otros compuestos fenólicos, pigmentos (carotenoides y clorofilas), esteroides, ácidos grasos libres, mono y diacilglicéridos [Hamam F. y Fereidoon S., 2006]

Entre los anteriores compuestos, se destacan:

- Monoacilglicéridos y Diacilglicéridos:

En estos compuestos el glicerol se encuentra esterificado únicamente con uno o dos ácidos grasos, quedando libres 1 o 2 grupos hidroxílicos; al carácter hidrofílico de estos grupos deben estas sustancias sus buenas propiedades emulsificantes [Kairu L., 2002].

- Tocoferoles

Constituyen la vitamina E, pertenece al grupo de vitaminas liposolubles e incluyen cuatro homólogos naturales (α , β , δ y ρ). Generalmente, la actividad antioxidantes de los tocoferoles está en el orden: $\rho > \delta > \beta > \alpha$ y tocoferol [Hamah F. y Fereidoon S., 2006]. Los aceites vegetales y los productos elaborados con ellos contienen normalmente grandes cantidades de tocoferol, especialmente los isómeros α , β y δ . Además algunos aceites vegetales, especialmente, el aceite de palma y el aceite de salvado de arroz, son fuentes muy ricas de tocotrienoles (análogos) con una débil actividad como vitamina E, pero que actúan como antioxidantes y proporcionan estabilidad contra la oxidación.

- Colorantes:

Los carotenoides son hidrocarburos liposolubles altamente insaturados derivados del poliisopreno. Se sabe que en las grasas animales y vegetales están presentes más de 75 carotenoides diferentes y son normalmente los que dan el color

amarillo a rojo intenso a las frutas, hortalizas, cereales y aceite de palma bruto [FAO., 1997].

Los colorantes carotenoides disminuyen por hidrogenación, por tratamiento térmico o por oxidación. Se ha demostrado que el β -caroteno también presenta actividad antioxidante y prooxidante, su actividad depende de la concentración usada, de otros antioxidantes. Se ha propuesto que el β -caroteno atrapa el radical peroxi bajo condiciones en donde el oxígeno se encuentra en alta tensión o bajo condiciones atmosféricas por un mecanismo de adición [Osborn H. y Casimir A., 2003].

1.1 GRASAS ESPECIALES

Las grasas especiales son consideradas sistemas grasos naturales a los cuales se les han cambiado sus características nutricionales y funcionales, proporcionando la consistencia deseada para satisfacer las necesidades específicas del consumidor y la calidad del producto final [Ghotra B. *et al.*, 2002].

Según contengan o no agua, por ser sistemas grasos polifásicos, se clasifican en dos grupos diferentes:

- a) Mezclas de triacilglicéridos líquidos y sólidos: sebo, manteca y las denominadas “grasas concretas”, más conocidas por el término inglés “*shortening*” y

- b) Sistemas en que el medio líquido es una emulsión, predominantemente de agua/aceite como la mantequilla y la “margarina” [Primo E., 1998].

1.1.1 Producción de Grasas Especiales

Se han usado diferentes grasas y aceites en la dieta humana, incluyendo aceites que se originan de frutos como el aceite de palma y el aceite de oliva, o de semillas de algodón, maíz y soya, así como las grasas de los tejidos adiposos de los pollos, cerdos, corderos y ganado. También de fuentes marinas como aceite de pescado. De la palma se obtiene aceite tanto del mesocarpio carnoso de la fruta (aceite de palma) como de su almendra (aceite de palmiste), además de sus fracciones: Oleína (líquida), estearina (sólida) y la superestearina (proveniente de un doble fraccionamiento).

Estas grasas poseen en general perfiles de ácidos grasos complejos incluyendo distintos isómeros, ácidos grasos con diferente longitud de cadena y grado de insaturación [Mu H. y Trine P., 2005].

Actualmente se utilizan tecnologías de procesamiento químico (hidrogenación e interesterificación) y físico (fraccionamiento) que proveen a la industria de alimentos la capacidad de modificar una o varias propiedades fisicoquímicas, funcionales y organolépticas de una grasa [Grompone A., 1992, Bermúdez A., 2003, Hunter J., 2005].

La composición de ácidos grasos de algunas grasas y aceites más comunes se muestra en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Composición de ácidos grasos de aceites vegetales

Ácido Graso	No. de Carbonos	Aceite de palmiste ^a	Aceite de palma ^b	Aceite ^e de soya	Girasol ^d	Oliva ^e
Caprilico	8	6				
Cáprico	10	5				
Laúrico	12	48				
Mirístico	14	16				
Palmítico	16	8	46	11	4	14
Estearico	18	4	5	4	3	
Araquídónico	20			1		0.5
Palmitoleico	16:1					1-2
Oleico	18:1	15	39	23	34	72
Linoleico	18:2	3	9	53	59	9
Linolénico	18:3		5	8		1

Valores en porcentaje de ácido graso presente

^{d,b} Ghotra B. *et al.*, 2002

^{c,a,e} Primo. E, 1998

a. *Fraccionamiento*

Este proceso consiste en la separación, mediante algún método físico, de dos o más fracciones de un lípido; con este sistema se obtienen, a partir de aceites de

palma y de soya, productos como oleína, estearina y otros, que han sido utilizados como sustitutos de grasas más costosas como la de cacao [Badui S., 1996].

Puede realizarse por tres procedimientos:

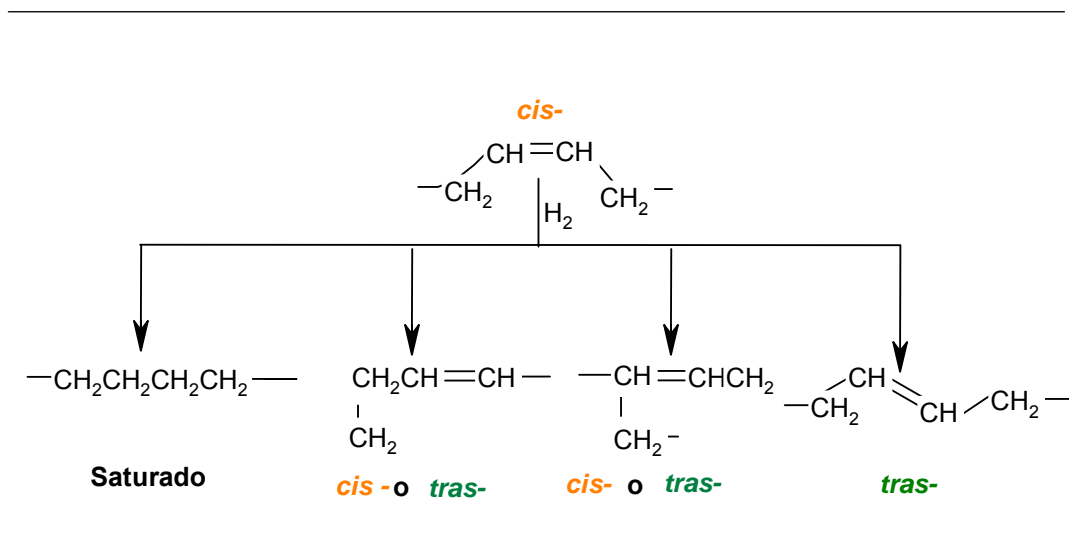
- a) Cristalización en seco, que consiste en el enfriamiento controlado de la grasa fundida hasta formar una fase sólida, que puede ser separada por filtración de la fase líquida remanente.
- b) Enfriamiento controlado de la grasa disuelta en un solvente orgánico, hasta formar cristales que pueden ser separados por filtración de la solución.
- c) Agregado de una solución acuosa que contiene un surfactante y un electrolito, a la grasa parcialmente cristalizada por enfriamiento controlado, formando así una emulsión de la fase sólida, que se puede separar por centrifugación [Grompon M., 1992].

b. *Hidrogenación*

La reacción de hidrogenación consiste en la adición de hidrógeno a los dobles enlaces de los ácidos grasos insaturados, catalizada por un metal, originando su saturación. En el contacto con el catalizador (níquel es el más usado) algunos enlaces pueden adquirir la configuración *trans* --, cambiar de posición, variar la geometría, el número y situación de los dobles enlaces (**Esquema 2**) alterando las propiedades físicas y químicas de las grasas, como la elevación del punto de fusión y la disminución del índice de yodo [Barrera D. y Block J, Primo E., 1998].

De esta manera, la hidrogenación podría también definirse como un proceso que imparte estabilidad oxidativa a los aceites manteniendo sus características organolépticas y una vida de anaquel más larga [Ghotra B. *et al.*, 2002].

Esquema 2. Proceso de hidrogenación



El proceso de hidrogenación produce aceites y grasas con buena sensación bucal, mejora el color, punto de derretimiento y cualidades de lubricación, aplicadas especialmente a las grasas líquidas que se han de transformar en plásticas destinadas a la fabricación de margarinas y “shortening”. Sin embargo, la hidrogenación también cambia las propiedades nutricionales de algunas grasas, muchos ácidos grasos poliinsaturados pierden su actividad biológica cuando son convertidos a isómeros *trans* - [Hotchkiss P., 1997].

Los isómeros *trans*- (conocidos como grasas *trans*-) se consideran isómeros de grasa no naturales, teniendo en cuenta que en la naturaleza los ácidos grasos se

encuentran con más frecuencia en la forma *cis*-, siendo los isómeros *trans*-prácticamente inexistentes en aceites y grasas de origen vegetal.

Es posible hacer productos con un funcionamiento equivalente y con un contenido bajo de ácidos grasos *trans*- aumentando el grado de hidrogenación, pero se produce un aumento de ácidos grasos saturados, que no ofrecen un resultado equivalente en cuanto a la aceptabilidad de los alimentos que los contienen, principalmente por su efecto en la salud [Hunter J., 2005].

c. *Interesterificación*

El término interesterificación aplicado a las grasas y los aceites, se refiere a la reacción entre los diferentes triacilglicéridos con una reorganización de los grupos acilo dentro y entre los triglicéridos [Kellens M. y Antwerp B., 1997].

Al realizar la interesterificación de un lípido (de origen vegetal o animal) se induce el entremezclado de los ácidos grasos en las moléculas, independiente de la distribución natural en el lípido original, hasta que se logra un equilibrio en el que se han formado todas las especies posibles [Bermúdez A., 2003]. Esta técnica es empleada para cambiar las propiedades físicas de las grasas.

Generalmente el término interesterificación se emplea para aquellas reacciones donde una grasa u otro material compuesto de los ésteres de ácidos grasos, reaccionan con ácidos grasos (acidólisis), con alcoholes (alcoholólisis) [Schuchardt., 1998] con otros ésteres (transesterificación) o con el intercambio de grupos de ácidos grasos para producir un nuevo éster [Iwasaki Y. y Tsuneo Y., 2000, Kellens M. y Antwerp B., 1997].

Los diversos triacilglicéridos estructurados pueden producirse por interesterificación química o enzimática. Esta última usando lipasas con selectividad específica [Mu H. y Trine P., 2005].

Para la interesterificación química, se requiere altas temperaturas y catalizadores alcalinos, siendo los más comunes los metales alcalinos tales como sodio, potasio y sus aleaciones, y los alcóxidos tales como el metilato de sodio y el etóxido de sodio. Además, los hidróxidos tales como el hidróxido de sodio, son empleados en ciertas ocasiones, siendo menos activos y en consecuencia requieren mayores temperaturas (superiores a 150°C). Uno de los catalizadores más empleados en la actualidad es el metilato de sodio.

La interesterificación química, puede tener lugar entre ácidos grasos de la misma molécula de triacilglicérido (intercambio intramolecular) o entre los diferentes triacilglicéridos (intercambio intermolecular) [Kellens M. y Antwerp B., 1997, Ghotra B. *et al.*, 2002].

Aunque la interesterificación química es simple y económica, la redistribución de ácidos grasos se puede llevar a cabo al azar o de un modo dirigido. En el primer caso se obtiene una composición equilibrada, correspondiente a la ley de probabilidad: los ácidos grasos son redistribuidos de manera no selectiva. En contraste, las reacciones catalizadas por enzimas son más prometedoras para modificar posiciones específicas de los lípidos.

Las lipasas son enzimas termoestables, derivadas de diferentes microorganismos, pueden ser inmovilizadas en una matriz granulada y actuar al azar ó de manera

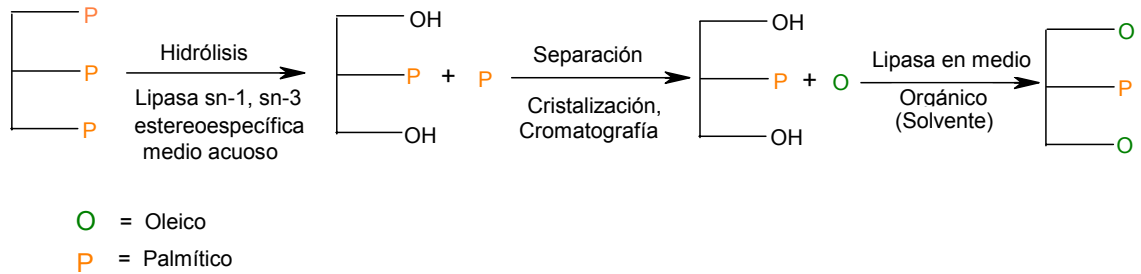
específica en las posiciones 1 y 3 de los triacilglicéridos [Hunter J., 2005]. El uso de lipasas estereoespecíficas ha permitido mediante técnicas de biotecnología, la obtención de lípidos estructurados (**Esquema 3**) con una estereoquímica establecida y constante.

La estructura tridimensional de de las lipasas posee un sitio activo formado por una terna Ser-His-Asp/Glu. Durante la interesterificación el grupo hidroxilo de la serina se activa inicialmente por una sucesión de desplazamientos de cargas eléctricas las cuales afectan la triada catalítica. El mecanismo involucra dos intermediarios, el primero de ellos se forma por un ataque nucleofílico de los pares electrónicos del oxígeno del carbono sp^2 del enlace éster. Seguido de la formación del enlace CO, que conlleva a la liberación del radical alcoxi, el cual toma el protón del ión imidazolio para formar un alcohol libre.[Valenzuela J. *et al.*, 2002].

La interesterificación enzimática puede ser utilizada como alternativa al proceso de hidrogenación, con lo cual se pueden obtener productos a partir de aceites con una consistencia apropiada para ser empleados como grasas especiales eliminándose en esta forma la producción de isómeros *tran*- [Bermúdez A., 2003].

Hoy por hoy es posible modificar las propiedades físico-químicas de las grasas y los aceites con la ayuda de esta moderna tecnología. Sin embargo, durante la reacción de interesterificación enzimática se producen algunos cambios en la composición de los triacilglicéridos [Valenzuela J. *et al.*, 2002], pueden eliminarse componentes menores, que favorecen la oxidación de los aceites modificados [Hamam F.y Fereidoon S., 2006].

Esquema 3. Procedimiento enzimático para obtener lípidos estructurados



1.1.2 Tipos de Grasas Especiales

a. Shortenings

Los *shortenings* son mezclas artificiales formadas por aceites hidrogenados o interesterificados y grasas de punto de fusión adecuado, utilizadas para pastelería y panadería. Contienen monoacilglicéridos, diacilglicéridos y compuestos relacionados. Presentan la función de retener aire, ya sea batidos en una masa de pastel o en la crema de un helado [Hotchkiss P., 1997].

El término “*shortening*” es utilizado para designar las grasas plásticas comestibles anhídridos; estas grasas son semisólidas, proporcionan una textura tierna a los

productos horneados, favorecen la aireación de los productos fermentados y promueven una textura y sabor agradable [FAO., 1997].

Las propiedades de los *shortenings* dependen del efecto lubricante de la grasa utilizada y de su tendencia a formar películas finas, envolventes de los glóbulos de masa, que dan al producto terminado un aspecto esponjoso, por incorporación de aire durante el amasado y el batido, o la estructura hojosa, por laminación, permitiendo elaborar pasteles con altos niveles de agua y azúcar, haciéndolos más húmedos y suaves.

La calidad de los “*shortening*” está subordinada a tres factores:

- a) Cantidad de aire incorporado
- b) Plasticidad y consistencia
- c) Relación de la fase sólida y la fase líquida

Estas características físicas, dependen, a su vez, de los métodos de preparación y de las formas polimórficas (formas de cristalización) de las grasas utilizadas; la forma β' es favorable porque da cristales que embeben la fase líquida y favorecen la plasticidad y las propiedades para hornear; en cambio, la forma tipo β da cristales grandes, estructura granulada y menor capacidad para incorporar aire en las pastas [Ghotra B. *et al.*, 2002, Primo E., 1998].

b. *Margarinas*

Las margarinas pueden obtenerse de aceites vegetales que han sido hidrogenados o cristalizados para dar una textura apropiada de esparcimiento. Los

aceites vegetales pueden también ser mezclados con cantidades bajas de grasa animal.

Las margarinas deben tener una cierta estructura cristalina para mantener una consistencia semisólida a temperatura ambiente y a la temperatura de frigorífico. Se requiere que se derritan rápidamente a la temperatura corporal, sin dejar una sensación pegajosa [FAO., 1997].

Con la hidrogenación y la interesterificación, en condiciones adecuadas, se logran producir grasas que, además de fundir bien en la boca, presentan el margen de plasticidad necesario para una buena extensibilidad. En los dos métodos, los ácidos grasos quedan repartidos al azar y los glicéridos de la mezcla, mejoran el intervalo de plasticidad [Primo E., 1998].

c. Lípidos estructurados

Pueden ser definidos como triacilglicéridos reestructurados o modificados, en donde se altera la composición de los ácidos grasos y/o su distribución en las moléculas de glicerol; se preparan por interesterificación química o enzimática [Díaz O. y Gioielli L., 2003, Heinrich M. *et al.*, 2004, Lee J. *et al.*, 2004, Hamam F. y Fereidoon S., 2005] pueden ser sintetizados con diferentes ácidos grasos de cadena corta, media y larga, ácidos grasos saturados o insaturados [Moreno N. *et al.*, 2005, Lee J. *et al.*, 2004, Mu H. y Trine P., 2005,].

Un lípido estructurado, es una molécula “hecha a la medida”, formulada para una función nutricional o tecnológica específica. De esta manera se puede decidir el tipo de ácido graso y la posición de este en los triglicéridos que se desean estructurar [Valenzuela J. *et al.*, 2002].

Producir lípidos estructurados vía enzimática, podría ser una forma de proporcionar un ácido graso deseable, satisfaciendo requerimientos nutritivos o terapéuticos, como en el caso de lípidos sustituyentes de la leche materna [Bermúdez A, 2003].

Aunque la mayoría de lípidos estructurados son utilizados, actualmente, en aplicaciones médicas, algunos están siendo empleados en alimentos, como productos de confitería y chocolatería, tal es el caso de los equivalentes de la manteca de cacao [Díaz O. y Luis G., 2003, Bermúdez A., 2003, Arango L., 2004].

1.2 PRINCIPALES ALTERACIONES QUE AFECTAN LAS GRASAS

La estabilidad oxidativa es un indicador importante en el desempeño y la vida de anaquel de la grasa. Depende de la composición de la muestra y de las condiciones a las que está sujeta [Guillén y Cabo., 2002, Lee y col., 2004, Smith S. *et al.*, 2006]. La exposición al aire libre, a altas temperaturas, a la luz, a trazas de metales (hierro y cobre) y a la humedad refuerzan la oxidación [Lee J. *et al.*, 2004, Naz S. *et al.*, 2004-2005]. Igualmente, la composición de la grasa: contenido de ácidos grasos insaturados, número y posición de los dobles enlaces, tipo de isomería (*cis-* y *trans-*) [Nieblas S. *et al.*, 2001, Rudnik E. *et al.*, 2001, Lee J. *et al.*,

2004, Aardt M. *et al.*, 2004, Haman y Shahidi., 2005] y el contenido de antioxidantes [Hamah F. y Shahidi., 2006, Osborn H. y Akoh C., 2003], influyen en el proceso de oxidación.

La estabilidad oxidativa, se define como la resistencia a la oxidación bajo condiciones establecidas [Velasco J. *et al.*, 2004, Guillén M. y Nerea C., 2002] y se expresa como el periodo de tiempo necesario para alcanzar un punto final, el cual es seleccionado conforme a diferentes criterios (por ejemplo, desarrollo de la rancidez), pero usualmente corresponde a un inesperado incremento en la reacción de oxidación [Velasco J. *et al.*, 2004]. Como la oxidación normalmente procede lentamente hasta que este punto se alcance, este periodo de tiempo es conocido como periodo de inducción.

El periodo de inducción se determina, midiendo un parámetro físico o químico con el tiempo a través de un calentamiento de la muestra a temperatura constante. Dicho parámetro relaciona el grado de oxidación de la misma y puede usarse para evaluar, el momento en cual la grasa llega a un nivel de oxidación inadecuado para el consumo humano [Gonzaga F. y Celio P., 2006].

El deterioro de los lípidos se relaciona en general con el término “rancidez” dándose principalmente dos reacciones: lipólisis o rancidez hidrolítica y autooxidación o rancidez oxidativa [Badui S., 1996].

1.2.1 Lipólisis o enranciamiento hidrolítico

Este tipo de enranciamiento ocurre generalmente, en presencia de calor y humedad catalizado por enzimas lipolíticas llamadas lipasas. La hidrólisis de los triglicéridos deja en libertad glicerol, ácidos grasos libres, monoacilglicéridos y diacilglicéridos. Las lipasas actúan en las interfaces agua/aceite o grasa y por tanto, su accionar hace que se eleve la acidez libre de los mismos [Kairuz L., 2002].

En el caso de algunos aceites vegetales, los ácidos grasos liberados por las lipasas son de más de 14 átomos de carbono, poco volátiles y por tanto no se perciben por el olfato; su presencia sólo se puede advertir mediante la determinación del índice de acidez y de otras características [Badui S., 1996]. Sin embargo, los tratamientos térmicos que se aplican a los aceites y grasas comerciales durante el procesamiento destruyen las lipasas, por lo cual este tipo de rancidez se presenta más frecuentemente cuando se utilizan productos que no han sido procesados a temperaturas suficientemente altas para destruir estas enzimas [Kairuz L., 2002].

A diferencia de otras reacciones enzimáticas, la lipólisis se puede efectuar en condiciones de actividad acuosa muy baja, debido a que, si los triglicéridos se encuentran en estado líquido, tienen una gran movilidad y pueden favorecer el contacto con la lipasa y provocar la reacción.

1.2.2 Autooxidación o enranciamiento oxidativo

Este tipo de enranciamiento se debe a la oxidación atmosférica de la grasa, razón por la cual es conocido también como autooxidación, por ser un mecanismo que

genera compuestos que a su vez mantienen y aceleran la reacción [Badui S, 1996].

La acción del oxígeno atmosférico, sobre las cadenas alifáticas poliinsaturadas de los ácidos grasos, da lugar al sabor y olor típicos, fuertes y desagradables de las grasas oxidadas [Primo E., 1998]. Sin embargo, existen enzimas como las lipoxigenasas y ciclooxigenasas [Niké. *et al.*, 2005] o las hidroperóxidasas, enol isomerasa, alcohol deshidrogenasa, aldehído deshidrogenasa, entre otras, que son responsables de la descomposición de los hidroperóxidos lipídicos, siendo la lipoxigenasa la enzima clave de todo el proceso [Zamora R. *et al.*, 1991].

La autooxidación es la causante de la mayor parte de los problemas de deterioro de los productos grasos y generalmente envuelve un mecanismo en cadena de radical libre [Tian K. y Purnendu D., 1999, Naz S. *et al.*, 2005]. Este El mecanismo comprende tres fases (**Esquema 4**) [Daniela R. *et al.*, 2006].

- Iniciación o de formación de radicales libres (hidroperóxidos).
 - Propagación o de reacción de los radicales libres entre sí
 - Terminación o de constitución de productos no radicales (alcoholes, compuestos carbonílicos) [Millar., 2001, Niki E. *et al.*, 2005, Tian K. y Purnendu D., 1999].
-
- **Iniciación:**

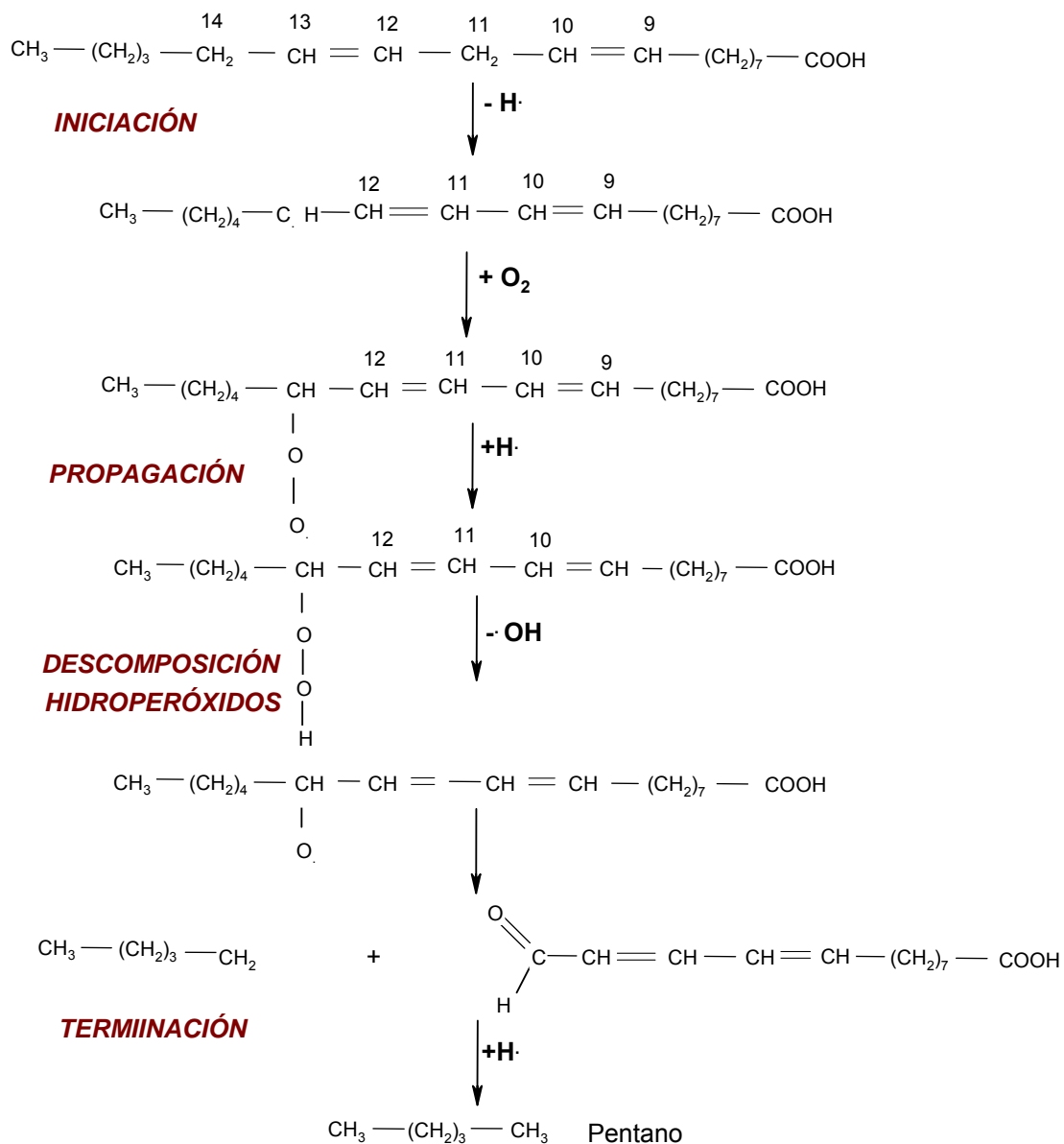
En este primer paso, se presenta una abstracción de átomos de hidrógeno (**Esquema 5**) que puede ser un hidrógeno alílico de un ácido graso o cualquier

otro hidrógeno que se encuentre débilmente enlazado cerca de una insaturación, dando lugar a un nuevo radical [Hidalgo F. *et al.*, 1991; Aardt M. *et al.*, 2004]. Estos hidrógenos metilénicos (CH₂) están activados por la vecindad de los dobles enlaces y son más reactivos que los otros, razón por la cual, los compuestos poliinsaturados de las grasas se oxidan más rápido que los saturados, en quienes únicamente sucede la oxidación cuando las condiciones son muy fuertes

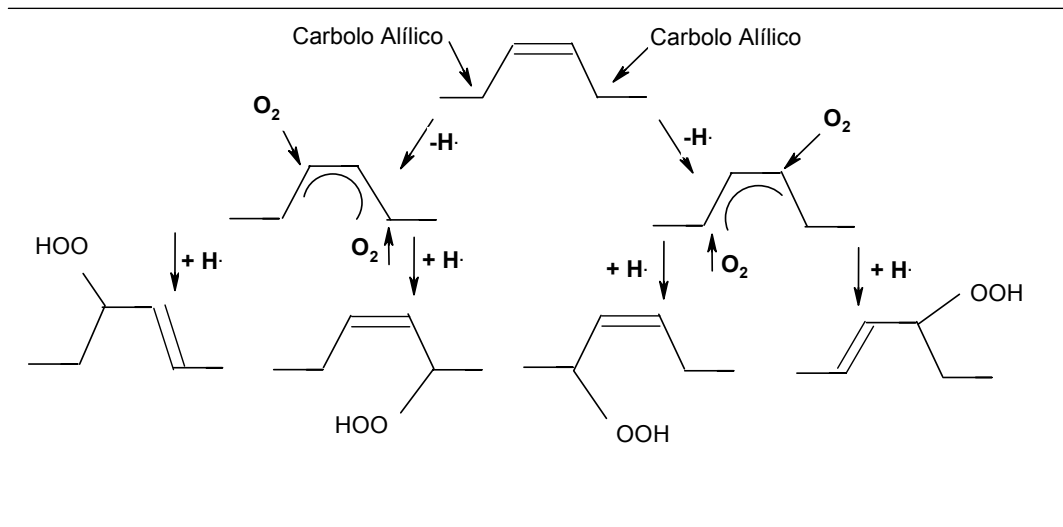
La energía de un fotón, sobre uno de estos hidrógenos lábiles, produce un radical inestable, el cual se estabiliza electrónicamente formando híbridos de resonancia conjugados (dienos o trienos conjugados), consiguiéndose de esta manera una estructura mesomérica más estable para que los radicales fijen oxígeno [Primo E., 1998].

El oxígeno triplete (³O₂), a diferencia del oxígeno singulete (¹O₂), no ataca el doble enlace de un ácido graso, sino que reacciona con los radicales libres para formar radicales peróxido [Miller., 2001]. Esto ocurre, debido a que el oxígeno en su estado normal de triplete (sus dos electrones más externos tienen un spin igual) es muy poco electrófilo y por sí sólo no actúa sobre los dobles enlaces; mientras que en la configuración electrónica singulete, donde los spin son diferentes, se presenta una fuerte repulsión entre ellos, de manera que el átomo de oxígeno queda excitado, muy electrófilo y lo suficientemente reactivo como para unirse directamente a los ácidos grasos, lo cual se facilita porque estos últimos también están como singulete [Badui S, 1996].

Esquema 4. Mecanismo de oxidación del ácido linoleico con oxígeno triplete



Esquema 5. Abstracción de hidrógeno de un carbono alílico en la oxidación de un radical libre de un ácido graso



- **Propagación**

El radical formado en la etapa de la iniciación, propaga la reacción de radical libre abstrayendo un átomo de hidrógeno del medio, creando así otro radical libre.

Subsecuentemente, la reacción directa de los ácidos grasos insaturados con el O_2 es termodinámicamente difícil, la producción de los primeros radicales necesarios para empezar la propagación debe ocurrir por algún medio catalítico; el calor, la exposición a la luz o mecanismos donde el oxígeno singulete es la especie activa, dan lugar a la descomposición de los hidroperóxidos formados [Naz S. *et al.*, 2005].

Estos compuestos son susceptibles de presentar una disociación homolítica por pérdida de un protón o de un radical hidroxilo. En el primer caso, la reacción es normalmente reversible mientras que en el segundo caso no ocurre [Hidalgo F. *et al.*, 1991].

- **Terminación**

Los radicales formados pueden terminar la reacción por acoplamiento con otros radicales o por la incorporación al sistema graso de un antioxidante, el cual actúa como un atrapador de radicales libres, finalizando de esta manera la fase de propagación

Otra forma de finalizar el proceso de autooxidación es la reestructuración y la ciclización de los radicales peróxidos [Niki E. *et al.*, 2005] formando especies relativamente estables, no iniciadoras y no propagadoras, como compuestos volátiles y no volátiles (aldehídos, cetonas, alcoholes, ácidos, etc.,) que por posteriores autooxidaciones se transforman en los polímeros y otros productos característicos de un sistema lipídico oxidado [Bermúdez A., 2003].

Los compuestos volátiles son centro de atención principalmente por tres razones:

- 1) Muchos de ellos son compuestos de elevada importancia sensorial, con la incidencia que tal propiedad tiene en el olor y el olor de los alimentos.

- 2) Sirven de base al conocimiento de muchas reacciones implicadas en la degradación termoxidativa.
- 3) Su identificación permite establecer las posibilidades de reacciones con otros compuestos de la dieta [Dobarganes M. *et al.* 1995].

La formación de muchos de estos compuestos se explica a partir de la estructura original de los hidroperóxidos, que se reestructuran siguiendo unas rutas principales de ruptura de molécula y otras reacciones inusuales aun no muy bien elucidadas. La degradación de aldehídos saturados en un medio que se encuentra autooxidado puede ser representado por una secuencia de reacciones desde los hidroperóxidos [Hidalgo F. *et al.*, 1991].

1.3 MÉTODOS EMPLEADOS PARA DETERMINAR LA OXIDACIÓN EN LAS GRASAS

La industria de alimentos ha usado una serie de métodos para analizar diversos intermedios o productos de la oxidación; estos varían desde las evaluaciones sensoriales sencillas, que son poco precisas y muy subjetivas, hasta algunos análisis químicos y físicos que requieren de instrumentos complejos, más reproducibles y sensibles que cuantifican objetivamente la intensidad de la oxidación.

A continuación se hará una breve descripción de cada uno de los métodos más utilizados por la industria de alimentos, los cuales miden la estabilidad oxidativa de las grasas y los aceites.

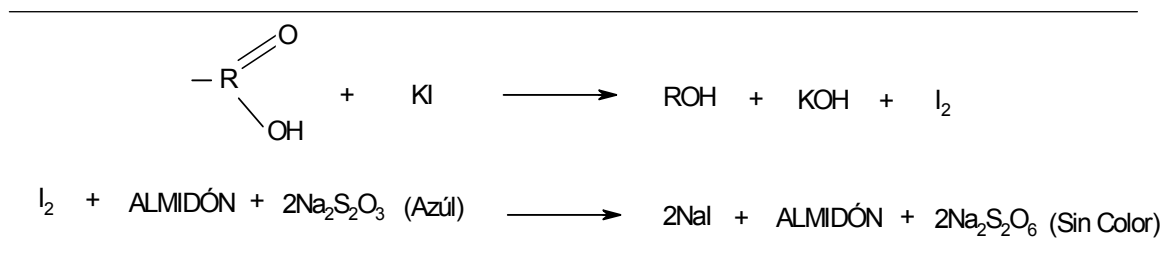
❖ **Índice de Peróxidos (PV)**

Es el método clásico para medir la oxidación de grasas y aceite, con él se mide la concentración de los intermedios inestables, formados en la primera fase del proceso de oxidación que posteriormente se descomponen para dar los compuestos secundarios de oxidación [Guillén M. y Nerea C].

En las primeras fases de la oxidación (periodo de inducción) la formación de peróxidos es lenta variando desde unas semanas a varios meses, de acuerdo a la clase de aceite, a las condiciones de almacenamiento, al tipo y contenido de antioxidantes [Nieblas M. *et al.*, 2000 – 2001]

El método tradicional, se basa en la capacidad de los peróxidos, para oxidar el ion yoduro de KI y producir yodo que se valora con una solución estandarizada de $2\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$; también se puede emplear óxido ferroso y cuantificar el ion férrico formado, la cantidad de $2\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ consumido es proporcional a la cantidad de peróxidos presentes en la muestra (**esquema 6**), [Hotchkiss P., 1997].

Esquema 6. Determinación de los hidroperóxidos lipídicos



El ensayo oficial de la AOAC es el que más se emplea y el que generalmente se usa para efectos comparativos [Badui S., 1996].

Este método es útil para lípidos voluminosos, como los presentes en los alimentos [Moreno C. y Larrauri J., 1998], un PV > a 2 es un indicador de que el producto tiene un gran potencial de rancidez y que puede fallar cuando se encuentre en anaquel.

Una sola medida del contenido de peróxidos puede ser usada como un índice del estado oxidativo de la grasa, sólo si los peróxidos formados son lo bastante estables de modo que no se descompongan después de la formación [Tian K. y Purnendu D., 1999].

Si bien el índice de peróxidos ha sido una medida corriente de la oxidación lipídica, su utilización se limita a las etapas iniciales de la reacción. Como los hidroperóxidos sufren reacciones posteriores de descomposición, la historia oxidativa completa de la grasa no se revela en su índice de peróxidos; éste puede ser bajo porque el material es de buena calidad o porque se ha reducido por algún proceso, enmascarando su deterioro verdadero [Grompone M., 1991].

❖ **Índice de *p*-Anisidina (AV)**

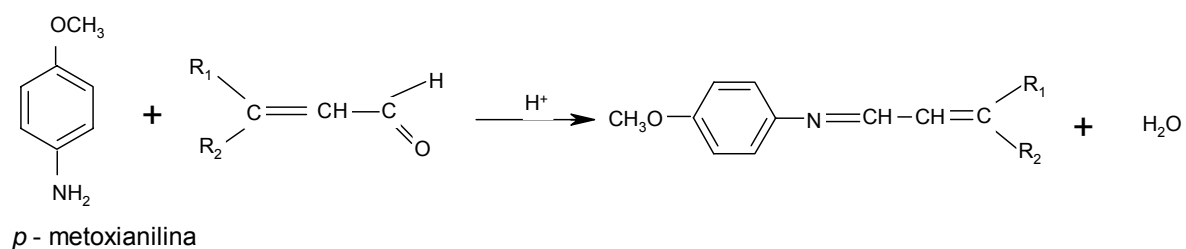
Es una estimación de los productos secundarios de oxidación [Guillén M. y Cabo N., 2002]. Se define, por convención, como 100 veces la absorbancia medida a 350 nm en una celda de un cm de espesor, de una solución que contiene 1.00 g de aceite en 100 mL de una mezcla de solvente y reactivo.

La prueba del índice de *p*-anisidina es particularmente útil para aceites con bajos índices de peróxidos.

El principio de éste método radica en la reacción de condensación entre los dienales conjugados o 2-alquenes de la muestra y el reactivo de *p*-anisidina (*p*-metoxianilina) en solución de iso-octano seguido por determinación espectrofotométrica a 350 nm [Miller., 2001] (**Esquema 7**).

La intensidad del color de los productos amarillentos formados depende no solo de la cantidad de compuestos aldehídicos presentes sino también de su estructura: un doble enlace en la cadena carbona, conjugado con el doble enlace del carbonilo, aumenta la absorbancia molar [Grompone M., 1991, Nieblas M. *et al.*, 2001].

Esquema 7. Reacción de los compuestos aldehídicos con el reactivo *p*-anisidina



Los aldehídos son productos de la descomposición de los ácidos grasos peroxidados. Este ensayo mide los niveles de aldehídos utilizándolos como un indicador que determina la cantidad de material peroxidado que ha sido

desdoblado. Los aceites con buena estabilidad oxidativa deberán tener valores de *p*-Anisidina no mayores de 2 mmol/kg.

En 1991 Grompone estudio aceites que tenían índices de peróxidos bajos y similares inicialmente e índices de *p*-anisidina diferentes, concluyendo que cuanto menor era el índice de *p*-anisidina inicial, más días demoraba el aceite para que su índice de peróxido aumentara de manera significativa; es decir el periodo de inducción dependía del índice de *p*-anisidina de partida, remarcando el papel que tenía este índice sobre el comportamiento posterior del aceite.

❖ ***Índice de Acidez (IA)***

En general el índice de acidez es una medida de la cantidad de cadenas de ácido graso que han sido hidrolizadas desde la estructura básica del glicerol, representa el número de KOH necesarios para saponificar los ácidos grasos libres de una grasa y se expresa generalmente como porcentaje de ácidos grasos calculados en términos del ácido oleico [Badui S., 1996].

La medida de los ácidos grasos libres permite evaluar el estado general de enranciamiento de un alimento ya que usualmente el enranciamiento hidrolítico acompaña el enranciamiento oxidativo [Kairuz L., 2002].

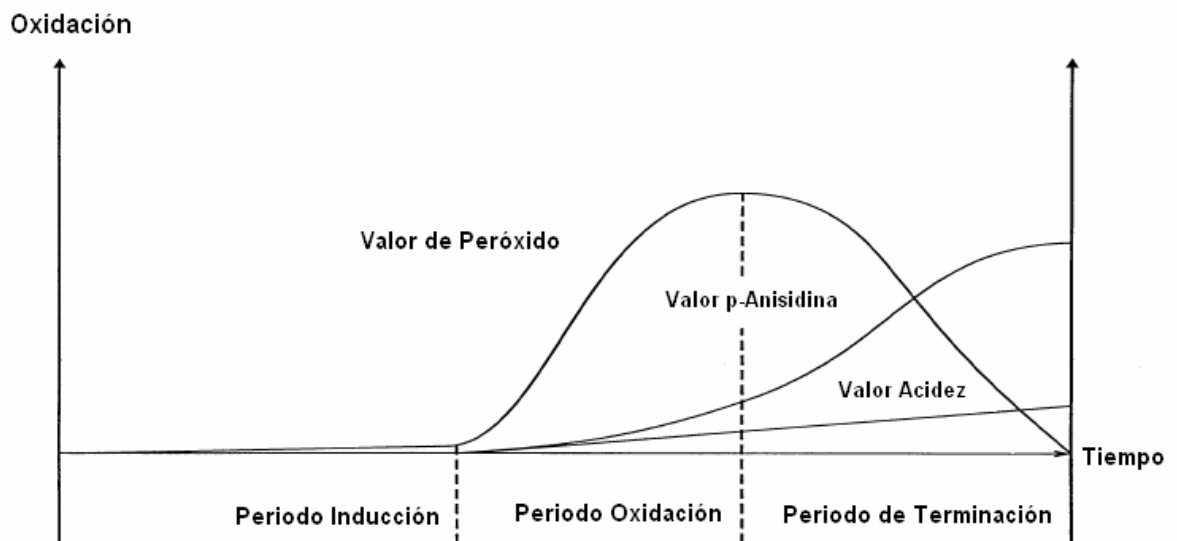
Su medida se realiza volumétricamente y consiste en una titulación con una base de concentración conocida, como el KOH y fenolftaleína como indicador, mientras que la materia grasa a valorar debe disolverse en un disolvente adecuado; a

través de este ensayo volumétrico se indica la cantidad de ácidos grasos libres o el índice de acidez [Osorio M., 2006].

Existen dos tipos de procedimientos normalizados, que se difieren uno del otro en algunos detalles, los que utilizan el etanol como disolvente y los que utilizan una mezcla de un alcohol con 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 la naturaleza de la muestra, así como de una agitación continua y efectiva.

Los índices descritos anteriormente, pueden estar relacionados con los tres estados de oxidación como se muestra en la **Figura 1** [Tomada de Grompone, M., 2005].

Figura 1. Estados de la oxidación lipídico

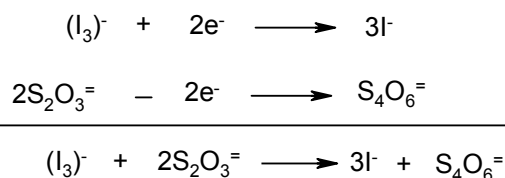


❖ *Índice de Yodo (IV)*

Los peróxidos lipídicos son capaces de oxidar el ion yoduro (I^-) a yodo (I_2), que puede determinarse con una valoración volumétrica con tiosulfato de sodio. Este método es útil para lípidos voluminosos, como los presentes en los alimentos [Moreno y Larrauri., 1998]. El yodo se adiciona a los dobles enlaces de los ácidos grasos insaturados cuantitativamente bajo condiciones controladas. En esto se basa químicamente la determinación del índice de yodo, el cual se define como: “El número de gramos de yodo absorbidos por 100 g de aceite o grasa”.

Las reacciones de titulación del yodo son las siguientes (**Esquema 8**) [Bernal I., 1994]:

Esquema 8. Reacciones de titulación del yodo con tiosulfato



El punto final se registra por la desaparición del complejo azul del yodo con el almidón.

Se han propuesto tres métodos generales para esta determinación, similares en su técnica; se diferencian sólo en la solución de halógeno utilizada así:

<i>MÉTODO</i>	<i>SOLUCIÓN HALOGENANTE</i>
Hübl	Yodo en alcohol HgCl ₂ en alcohol
Wijs	Cloruro de yodo en ácido acético
Hanus	Yodo bromuro en ácido acético

❖ ***Coeficiente de extinción específica a 269 nm ($E^{1\%}_{1cm}$)***

Los ácidos grasos poliinsaturados tienen una estructura de 1,4 pentadieno (R-CH=CHCH₂CH=CH-R). Cuando uno de los hidrógenos del metileno se separa para formar un radical libre, los dobles enlaces se reordenan para formar dobles enlaces conjugados. Los dienos conjugados absorben luz ultravioleta con más intensidad que los dienos no conjugados. Por tanto, La oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados produce trienos y dienos conjugados que están acompañados por un incremento en la absorción ultravioleta a 232 y 269 nm, respectivamente.

Por lo tanto, en las primeras etapas de la oxidación, la absorbancia en el ultravioleta aumenta. Posteriormente, disminuye a medida que se descomponen los hidroperóxidos que contienen dobles enlaces conjugados. [Miller., 2001].

La prueba espectrofotométrica en el ultravioleta puede proporcionar indicaciones sobre la calidad de un aceite. La absorción a determinadas longitudes de onda es debida a la presencia de dienos y trienos conjugados. Los valores de setas absorbancias se expresan en extinción específica $E^{1\%}_{1cm}$ es la extinción de una solución de la matriz grasa al 1% en el solvente empleado en cubetas de cuarzo

de espesor 1 cm. La extinción específica $E^{1\%}_{1\text{cm}}$ se expresa convencionalmente como K, también denominado coeficiente de extinción.

❖ **Ácidos Grasos**

La oxidación de las grasas resulta, en último término, de la destrucción en cadena de ácidos grasos insaturados. Por tanto, es posible medir el grado de oxidación por la pérdida de estos ácidos grasos (AGPI) [Moreno C. y Larrauri J., 1998].

En algunos casos se observan disminuciones superiores al 25 % en AGPI, por lo que algunos autores lo proponen como un índice muy sensible, especialmente para aceites con alto contenido de AGPI [Aparicio R. y Aparicio R., 2000, Park J. y Dong-sun I., 2003].

El método común para el análisis de los ácidos grasos se basa en la liberación de los ácidos grasos y su posterior evaluación por Cromatografía de Gases (método de análisis físico), después de su derivatización, por medio de metilación [Mondello L. et al., 2006, Park J. y Dong-sun I 2003].

❖ **Índice de la estabilidad oxidativa (rancimat)**

El índice de estabilidad de los aceites u oxidación inducida, también conocido como el método rancimat, permite determinar la estabilidad oxidativa automáticamente bajo condiciones de temperatura y tiempo estandarizadas

[Velasco J. *et al.*, 2004]. Fue desarrollado por Hadorn y Zurcher , se fundamenta en el hecho de que la mayoría de los productos volátiles de bajo peso molecular formados en la descomposición de los hidroperóxidos corresponden a ácido fórmico [Daniels R. *et al.*, 2006].

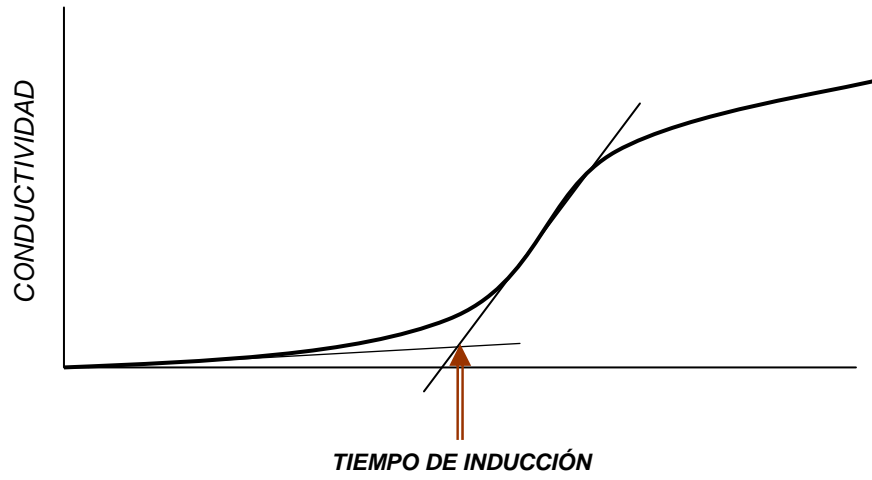
A las temperaturas del ensayo, el ácido fórmico es arrastrado por la corriente de aire y se disuelve en agua fría, provocando un aumento de conductividad en la misma [Moreno C. y Larrauri J., 1998, Tian K. y Purnendu D., 1999]. Este cambio de conductividad permite definir el periodo de inducción del aceite analizado (**Figura 2**).

En este ensayo, inicialmente se tiene el un período o tiempo de inducción, en el cual prácticamente no se forman productos secundarios, y una fase de oxidación rápida durante la cual el consumo de oxígeno y el aumento de peróxidos son muy elevados, es en esta fase donde comienzan a detectarse los productos volátiles. Si se sigue este proceso por los cambios que experimenta la conductividad, se obtiene una curva característica que presenta una variación brusca de pendiente entre los dos períodos. Es así como la oxidación, o la concentración de peróxidos se calcula en el rancimat como el tiempo de inducción.

El periodo de inducción se define como el tiempo necesario para llegar al punto de inflexión de la gráfica que representa la conductividad en función del tiempo. El tiempo de inflexión queda por tanto definido como el punto de intersección de las tangentes a las dos ramas de la grafica [Moreno C. y Larrauri J., 1998].

Se establece que la mejor estabilidad oxidativa para una muestra de aceite, esta relaciona con el tiempo de inducción más largo.

Figura 2. Tiempo de Inducción determinado por el rancimat



2. METODOLOGIA

Se evaluó la estabilidad oxidativa de tres tipos de grasas especiales, que fueron preparadas en el laboratorio en condiciones previamente fijadas en investigaciones anteriores [Moreno N. *et al.*, 2005] utilizando como enzima la lipasa inmovilizada de *Thermomyces lanuginosa* (Lipozyme TL, IM).

Sistemas grasos estudiados:

- Grasas *shortenings* (sistema I): Estearina de Palma - Aceite de Soya
- Equivalentes de la manteca de cacao (sistema II): Superestearina de Palma – Aceite de Palmiste.
- Una mezcla de lípidos estructurados (sistema III): Estearina de Palma- Aceite de soya – Aceite de Palmiste.

2.1. MATERIALES Y REACTIVOS

La Estearina de Palma, el Aceite de Soya, la Superestearina de Palma y el Aceite de Palmiste refinado comercial, fueron suministrados por la Empresa -SACEITES. S.A (Girón, Santander).

La lipasa estereoespecífica (sn-1) de *Thermomyces lanuginosa* inmovilizada en por adsorción en un soporte de sílice, la cual se conoce comercialmente como Lipozyme TL IM, se adquirió a la empresa Novozym S.A de Dinamarca.

Se utilizaron reactivos grado analítico como ácido acético ($\geq 98\%$), yoduro de potasio y metanol ($\geq 9.99\%$) obtenidos de J.T.Baker (Phillipsburg, U.S.A); cloroformo ($\geq 99.98\%$) de Mallinckrodt (Xalostoc, México); hexano ($\geq 96\%$), isooctano ($\geq 99.5\%$), tiosulfato de sodio ($\geq 99.5\%$), p-anisidina de Merck (Garmstadt, Alemania) y hidróxido de potasio ($> 85\%$), etanol ($\geq 99.8\%$) e indicadores de fenolftaleína y almidón, obtenidos de Carlo Erba.

Los patrones grado CG de F.A.M.E. Mix, C8-C28 (mezcla de metil ésteres de ácidos grasos), cat No. 18918-1AMP fueron obtenidos de Supelco (North Harrison Road, Bellefonte).

2.2 DESARROLLO EXPERIMENTAL

2.2.1 Pretratamiento general de la enzima

La enzima fue sometida a un pretratamiento para eliminar el aire y el agua, a fin de prevenir la reacción de hidrólisis y asegurar que el aceite penetre los poros del soporte.

Se pesó 80 g de la mezcla de los aceites vegetales, y 3.2 g de enzima, según el sistema de reacción. Se colocó la mezcla de los aceites junto con la enzima en un balón fondo plano esmerilado de 100 mL, el cual fue puesto en un termostato a 70°C , y al vacío a 25 kPa por 10 minutos. Finalmente se filtró y se lavó la enzima por triplicado con 80 g de las mezclas de los aceites vegetales, según el sistema

de reacción. Las condiciones utilizadas fueron establecidas previamente por Amado M y Rodríguez E, [2006].

2.2.2 Reacción de interesterificación enzimática

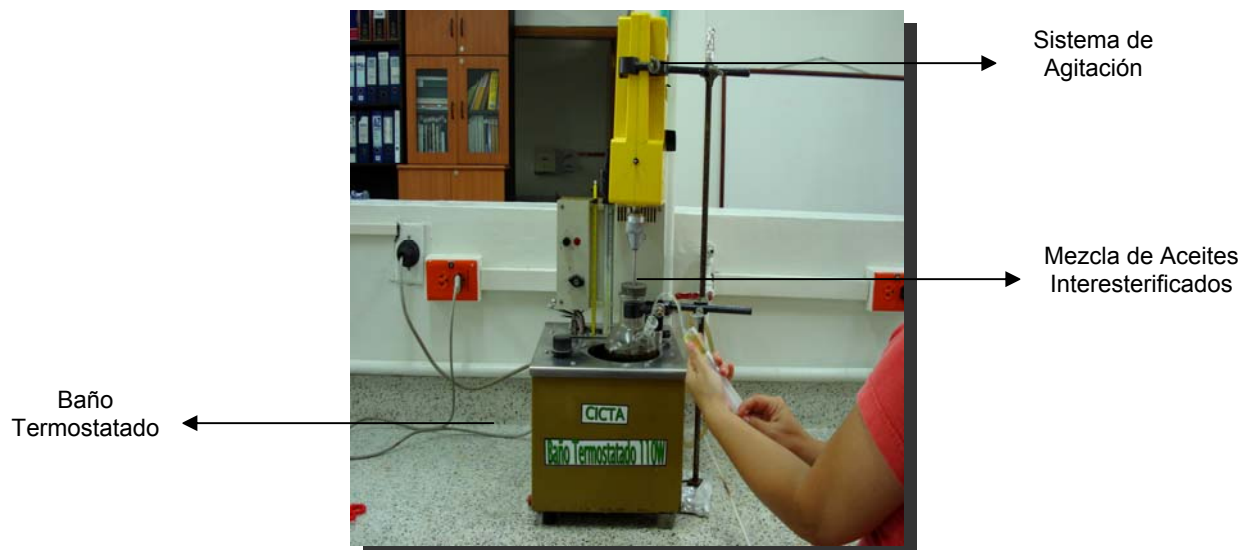
Se pesaron 320 g de las mezclas de los aceites vegetales, según el sistema de reacción estudiado, los cuales fueron calentados a 70°C, en un balón fondo plano de 500 mL, provisto de dos bocas esmeriladas. Posteriormente, se adicionó la enzima pretratada (1.0 % p/p de la mezcla de aceites) a la mezcla fundida y se dejó reaccionar por 3 horas (180 min) a 200 rpm. Las condiciones utilizadas fueron establecidas previamente por Moreno N. *et al.*, [2005].

2.2.3 Evaluación de la estabilidad oxidativa

Para evaluar la estabilidad oxidativa, se realizó un monitoreo periódico a lo largo de la reacción de interesterificación enzimática; tomando 12 g de aceite, cada 0, 30, 60, 90, 120, 150 y 180 minutos de reacción, empleando una jeringa plástica de 20 mL (**Figura 3**).

A cada muestra, se le determinó el índice de peróxido, índice de *p*-anisidina, índice de acidez y el coeficiente de extinción específica $E_{1\text{cm}}^{1\%}$.

Figura 3. Montaje empleado para monitorear la reacción de Interesterificación enzimática



De igual manera, se realizó un nuevo ensayo de la reacción de interesterificación para los tres sistemas, tomando 15 g de muestra al inicio y al final de la reacción, para el análisis del contenido de ácidos grasos, índice de yodo y la determinación del período de inducción por el método rancimat,

En todos los casos las muestras obtenidas se conservaron en frascos ámbar con tapa plástica, bajo atmósfera de N_2 , y congelación ($-15^{\circ}C$), hasta el momento del análisis.

2.3. METODOS DE ANALISIS

2.3.1 Análisis de Ácidos Grasos

El análisis de ácidos grasos se llevó a cabo mediante la obtención y cuantificación de sus metil ésteres por cromatografía de gases con detector de ionización en llama (GC - FID).

La conversión de ácidos grasos en metil ésteres, se realizó siguiendo el método descrito por Moreno N. y Durán (1999). Se pesó 0.5 ± 0.05 g de muestra, la cual se disolvió en 10 mL de hexano para posterior formación de los metilésteres mediante la adición de 500 μ L de una mezcla esterificada (metanol- KOH), la anterior solución se agitó por 3 min en un vortex y luego se dejó decantar durante unos minutos con la finalidad de que se separaran las dos fases. De la fase superior, se tomaron 200 μ L en un vial para posterior análisis, los metil esterres fueron analizados por cromatografía de gases siguiendo la NTC 5013.

Para el análisis los ácidos grasos y de los patrones se empleó cromatografía de gases. El equipo empleado fue un cromatógrafo de gases marca Agilent modelo HP-6890 Series GC System, equipado con un detector FID y un puerto de inyección Split/splitless (relación de split 100:1), a temperatura de 250°C, por inyección manual. Para la separación de los analitos se empleó una columna capilar de sílice fundida INNOWAX con fase estacionaria de polietilenglicol [30m x 0.32mm (d.i.) x 0.25 μ m (f.e.)]. La programación de la temperatura para la columna varió desde 50°C mantenidos por 2 minutos con una rampa de calentamiento de 4°C/min hasta 220°C y mantenida por 15 minutos. El flujo de gas en la columna

fue de 1.5mL/min, en modo de flujo constante. La temperatura del detector FID se mantuvo a 260°C, el flujo de aire fue de 350mL/min, el flujo de hidrógeno 35mL/min y el del gas helio 30cm/s.

Para la identificación de los ácidos grasos se compararon los tiempos de retención de las muestras con la de un patrón de referencia F.A.M.E. Mix, C4-C24 Cat No.18919 Marca Supelco analizado bajo las mismas condiciones de operación usadas para la muestra de ensayo.

La cuantificación se hizo relacionando el área de cada uno de los FAME'S con el área total reportada. De esta forma, se determinaron los porcentajes relativos de área (%) de ácidos grasos en las muestras analizadas.

2.3.2 Índice de Peróxidos

Este ensayo se realizó siguiendo la norma de la A.O.C.S. Cd 8-53 (1998). Se pesó 1.0 + 0.05 g de muestra homogenizada en un erlenmeyer de 150 mL. Se adicionó 6 mL de una solución de ácido acético: cloroformo a una relación 3:1 y se agitó hasta disolución. Luego se agregó 0.5 mL de solución saturada de KI utilizando una pipeta graduada. Se dejó en reposo, con agitación ocasional, por un minuto exacto en la oscuridad. Posteriormente se adicionó 6 mL de agua destilada. Se valoró con una solución de tiosulfao de sodio 0.002 N, previamente estandarizada frente a dicromato de potasio hasta casi desaparición del color amarillo, empleando unas gotas de solución indicadora de almidón 1.0 % y se continúa valorando hasta desaparición del color azul. Se agitó vigorosamente el matraz cerca del punto final, y se calculó la cantidad de peróxidos utilizando la siguiente expresión:

$$\text{Índice de peróxidos (meq O}_2\text{/k materia grasa)} = \frac{(V-V') \text{ ml Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot \text{N. 1000}}{\text{peso muestra}}$$

En donde:

V = volumen de solución de tiosulfato de sodio, en mL consumido en el ensayo de la muestra.

V' = volumen de solución de tiosulfato de sodio, en mL, consumido en el blanco.

N = normalidad de la disolución de tiosulfato de sodio.

m = peso, en gramos de la muestra.

Para cada ensayo realizado se pasó un blanco según lo requerido por la norma.

2.3.3 Índice de p – Anisidina:

Este ensayo se efectuó siguiendo la NTC 4197. Se preparó una solución de p-anisidina de concentración: 0.25 % p/v en ácido acético glacial. Se pesó 1.0 g de muestra en un matraz de 10 mL, después se disolvió y se aforo con isooctano. Posteriormente se transfirió 5 mL de esta solución a un tubo de ensayo, se adicionó 1 mL de la solución de anisidina, seguido de agitación continua y se mantuvo el tubo tapado en la oscuridad por 8 min a 24°C. Finalmente se transfirió la solución a una celda del Espectrofotómetro DR2000 para medir la absorbancia de un blanco frente a una solución de la muestra sin reaccionar. Se ajustó el 100% de transmitancia con el solvente y se calculó la cantidad de anisidina utilizando la siguiente expresión:

$$\text{Índice de Anisidina: } \frac{100QV (A_1 - A_2) - A_0}{\text{peso muestra}}$$

donde:

A_0 : Absorbancia de la muestra sin reaccionar

A_1 : Absorbancia de la muestra

A_2 : Absorbancia del blanco.

Q: Es el contenido de la muestra medida con respecto al índice de anisidina expresado en gramos por mililitro (Q: 0.01 g/mL).

2.3.4 Índice de Acidez:

La cantidad de ácidos grasos libres se determinó por volumetría, siguiendo la norma A.O.C.S Ca 5a-40. Se pesó 1.0 + 0.05 gramos de muestra. A continuación se adicionó 5 mL de alcohol neutralizado y unas gotas de fenolftaleína, posteriormente se calentó al baño maría y se agitó para disolver los ácidos grasos. Finalmente se valoró con una solución de Hidróxido de sodio 0.05 N estandarizada.

Se expresó la acidez libre en gramos de ácido oleico por 100 g de aceite ($PM_{\text{ácido oleico}}$: 282.4), por medio de la siguiente ecuación

$$\text{Índice de Acidez (\% ácido Oléico)} = \frac{28.2 \times V \times N}{P_m}$$

donde:

V = volumen de la solución valorante.

N = normalidad de la solución valorante

P_m = masa de la muestra en gramos ó en % de ácido Oléico. 1.0 ml de KOH

0.1 N = 0.028 g de ácido oleico.

2.3.5 Índice de Yodo

El índice de yodo se realizó siguiendo la norma de la A.O.C.S. /84.920.158/90. Se pesó 0.4 g de muestra en un erlenmeyer de 250 mL, con tapa esmerilada. A continuación se le adicionó 10 mL de cloro- para ayudar a disolver la muestra por rotación. Posteriormente se le adicionó 25 mL—de la solución valorada de IBr y se dejó tapado y en la oscuridad durante media hora, agitando a intervalos de 5 min. Con la boca del frasco inclinada, se le adicionó 10 mL de solución KI al 5%. A continuación se recogió todos los vapores de yodo y se enjuagó bien con 100 mL de agua destilada. Finalmente se tituló con el tiosulfato 0.1N hasta casi decoloración, adicionando 1 cm del indicador de almidón y se continuó la titulación hasta decoloración completa. Se realizó un ensayo en blanco utilizando las mismas cantidades de la solución de yodo y demás reactivos.

El índice de yodo se calculó por medio de la siguiente ecuación

$$IV = \frac{(a-b)N \times (126.9) \times (100)}{1000 \quad pm}$$

donde

a = mL de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ para la prueba blanco

b = mL de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ gastados en la muestra

$I_{\text{peq}} = 126.9/1000$

N = Normalidad de la solución de tiosulfato

pm = Peso de la muestra en gramos ó sabiendo que 1.0 ml de solución 0.1 N de yodo = 0.0127 g de yodo.

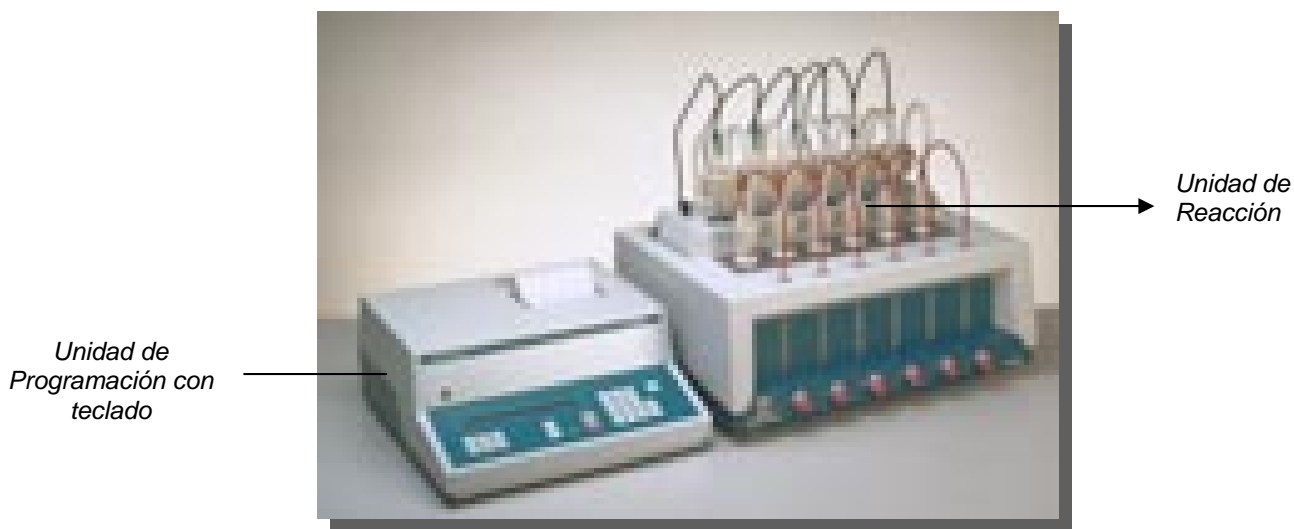
2.3.6 Coeficiente de extinción específica a 269 nm ($E^{1\%}_{1\text{cm}}$)

Se prepararon soluciones al 1 % de muestra en n-hexano y se midió la absorbancia a 269 nm en un Espectrofotómetro HP 845x UV-Visible, utilizando el n-hexano como blanco de referencia.

2.3.7 Determinación del período de inducción

Este análisis fue realizado en la Empresa (SACEITES), en el método rancimat , los productos de degradación volátiles son atrapados en agua destilada, medidos conductimétricamente y el tiempo de inducción determinado de las curvas de la conductividad contra el tiempo. Las mediciones fueron llevadas a cabo usando un equipo *Metrohm Rancimat 679* (**Figura 4**), bajo las siguientes condiciones: temperatura 110°C y flujo de aire de 20 l/hora.

Figura 4. Vista equipo rancimat 679



2.3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los valores presentados de los análisis de índice de peróxidos, índice de *p*-anisidina, índice de acidez, índice de yodo, Coeficiente de extinción específica a 269 nm ($E^{1\%}_{1\text{cm}}$), ensayo rancimat y la composición relativa de ácidos grasos son el resultado de cuatro determinaciones sobre el total de las muestras.

Los resultados reportados corresponden al promedio (\bar{x}), la desviación estándar (σ) y los coeficientes de variación (CV), siempre y cuando la diferencia de entre las mediciones no sobre pasara el 5%.

3. ANÁLISIS DE RESULTADOS

En el presente trabajo se determinó el comportamiento de las mezclas de los aceites vegetales a lo largo de la reacción de interesterificación enzimática. En adelante, para llevar a cabo la discusión de los resultados se emplean los términos: **Sistema I** para designar la mezcla de reacción *shortenings*: estearina de palma – aceite de soya, **Sistema II**, para el equivalente de la manteca de cacao: superestearina de palma – aceite de palmiste y el **Sistema III**, para designar al lípido estructurado: estearina de palma – aceite de palmiste – aceite de soya.

3.1 COMPOSICIÓN RELATIVA DE ÁCIDOS GRASOS

La composición de los ácidos grasos de un aceite o una grasa puede ser un indicador de su estabilidad, valor nutricional y propiedades físicas. En la **Tabla 2**, se presentan los resultados del análisis de la composición relativa de los ácidos grasos de las materias primas utilizadas en la reacción de interesterificación.

Los sistemas **I** y **III** presentan una relación similar de ácidos grasos saturados/ácidos grasos insaturados, y una similar concentración de ácidos grasos monoinsaturados (30 % aproximadamente) y ácidos grasos poliinsaturados (16%). Dentro de los ácidos grasos monoinsaturados el sistema **I** presenta una mayor concentración (29.9%) de ácido oleico, que el sistema **III** (27.8%). La concentración de ácido linoleico es igual en los dos casos, (15.2%) pero la concentración de ácido linolénico es ligeramente mayor en el Sistema **III**, 1.13%, contra 1.05 %, en el Sistema **I** respectivamente.

El sistema **II** en cambio, se caracteriza por tener una alta concentración de ácidos grasos saturados (73.6%), debido a la presencia de superestearina de palma. En este sistema los ácidos grasos insaturados constituyen el 26.7%, siendo el más abundante el ácido oleico, seguido del ácido linoleico.

En la **Tabla 3** se muestra la composición de ácidos grasos de los sistemas **I**, **II** y **III**, después de la reacción de interesterificación, en ella se espera ocurra reacomodación de los ácidos grasos en los triacilglicéridos, por lo cual, algunos de ellos pueden enriquecerse en ácidos grasos insaturados o en ácidos grasos saturados. Además si hay hidrólisis estos ácidos grasos pueden liberarse como ácidos grasos libres, pudiéndose afectar la estabilidad de la grasa.

Los cambios más notorios a nivel de ácidos grasos saturados e insaturados totales, se dan en el sistema de reacción **II**. Los ácidos grasos saturados disminuyen de 73.6% a 71.9%, mientras que los ácidos grasos insaturados aumentan de 26.7% a 28.1%. La disminución de los ácidos grasos saturados se da principalmente en el ácido palmítico cuya concentración cambia de 27.7 % a 25.2 %, mientras que el aumento en los ácidos grasos insaturados se refleja principalmente en la composición de los ácidos grasos oleico (que pasa de 22.3% a 23.4 %, y en el ácido linoleico que pasa de 4.4% a 4.7 %.

En el sistema **I** la composición en ácidos grasos saturados disminuye de 52.5 % a 51.2 % ($\Delta 1.3\%$), mientras que la de los ácidos grasos insaturados cambia muy levemente ($\Delta 0.2\%$). En este sistema los cambios en la composición de los ácidos grasos son leves. No se aprecia cambio en la composición del ácido linoleico, mientras la composición de ácido oleico y linolénico disminuye ligeramente

Tabla 2. Composición de ácidos Grasos de las materias primas utilizadas ^a

ÁCIDOS GRASOS	Estearina de Palma – Aceite de Soya							Superestearina – Palmiste							Estearina de Palma – Palmiste – Aceite de Soya						
	No. Determinaciones				σ	\bar{x}	CV,%	No. Determinaciones				σ	\bar{x}	CV,%	No. Determinaciones				σ	\bar{x}	CV,%
	1	2	3	4				1	2	3	4				1	2	3	4			
Saturados																					
Caprilico (8:0)	Nd	nd	nd	nd				3,07	3,15	3,09	3,11	0,03	3,11	1,10	0,73	0,7	0,75	0,72	0,02	0,73	2,87
Cáprico (10:0)	Nd	nd	nd	nd				2,36	2,45	2,4	2,38	0,04	2,40	1,61	0,50	0,52	0,47	0,5	0,02	0,50	4,14
Laurico (12:0)	0,27	0,27	0,27	0,28	0,005	0,27	1,85	28,1	28,9	28,3	28,5	0,34	28,5	1,20	6,51	6,16	5,87	6,07	0,27	6,15	4,35
Mirístico (14:0)	0,96	0,96	0,95	0,96	0,005	0,96	0,52	8,58	8,72	8,62	8,52	0,08	8,61	0,98	2,68	2,58	2,53	2,57	0,06	2,59	2,46
Palmítico (16:0)	46,6	46,6	46,6	46,6	0	46,6	0	27,3	28,1	27,6	27,9	0,35	27,7	1,26	41,5	41,3	40,1	41,2	0,63	41,0	1,53
Estearico (18:0)	4,65	4,65	4,62	4,62	0,02	4,64	0,37	3,36	3,11	3,28	3,15	0,12	3,23	3,58	4,07	4,14	4,28	4,2	0,09	4,17	2,14
Monoinsaturados																					
Palmitoleico (16:1)	0,13	0,13	0,14	0,14	0,006	0,14	4,28	nd	nd	nd	nd				0,15	0,15	0,14	0,15	0,01	0,15	3,39
Oleico (18:1 n-9)	29,9	29,9	29,9	30	0,05	29,9	0,17	22,6	21,4	22,5	22,7	0,61	22,3	2,72	27,3	27,8	28,3	27,9	0,41	27,8	1,48
Poliinsaturados																					
Linoleico (18:2 n-6)	15,2	15,3	15,2	15,1	0,08	15,2	0,37	4,52	4,27	4,5	4,38	0,12	4,42	2,63	15,3	15	15,3	15,1	0,14	15,20	0,93
Linolénico (18:3 n-3)	1,05	1,05	1,05	1,05	0	1,05	0	nd	nd	nd	nd				1,12	1,13	1,12	1,13	0,006	1,13	0,051
Araquidonico (20:4 n-6)	0,31	0,32	0,31	0,31	0,005	0,31	1,6	nd	nd	nd	nd				nd	nd	nd	nd			
Total Saturados					52.5					73.6					55.1						
Total Insaturados					46.6					26.7					44.3						
Monoinsaturados					30.0					22.3					28.0						
Poliinsaturados					16.6					4.42					16.3						

^a Expresado como porcentaje total de área de pico; nd: no detectado

Tabla 3. Composición de ácidos Grasos después de la reacción de Interesterificación enzimática ^a

ÁCIDOS GRASOS	Estearina de Palma – Aceite de Soya							Super estearina – Palmiste							Estearina de Palma – Palmiste – Aceite de Soya						
	No. Determinaciones				σ	x̄	CV,%	No. Determinaciones				σ	x̄	CV,%	No. Determinaciones				σ	x̄	CV,%
	1	2	3	4				1	2	3	4				1	2	3	4			
Saturados																					
Caprílico (8:0)	nd	Nd	nd	nd				3.32	3.12	3.30	3.15	0.10	3.25	3.14	nd	nd	nd	nd			
Cáprico (10:0)	nd	Nd	nd	nd				2.59	2.42	2.54	2.48	0.072	2.52	2.93	0.37	0.38	0.37	0.38	0.01	0.38	2.56
Laurico (12:0)	0.23	0.24	0.24	0.23	0.005	0.24	2.46	30.3	28.5	29.7	29.6	0.75	29.5	2.54	3.98	3.97	3.97	3.98	0.15	5.78	2.47
Mirístico (14:0)	0.85	0.84	0.85	0.85	0.005	0.85	0.64	8.87	8.50	8.72	8.70	0.15	8.70	1.75	2.45	2.45	2.42	2.47	0.06	2.45	2.23
Palmítico (16:0)	46.5	46.1	46.1	46.4	0.2	46.2	0.32	26.3	26.7	24.9	25.5	1.17	25.2	4.65	40.3	40.5	40.5	41.9	0.19	41.9	4.58
Estearico (18:0)	4.6	4.53	4.16	4.23	0.04	4.19	0.86	2.68	2.87	2.76	2.70	0.09	2.77	3.08	4.18	4.15	3.87	3.80	0.03	3.84	0.63
Monoinsaturados																					
Palmitoleico (16:1)	0.09	0.09	0.08	0.09	0.003	0.09	2.82	nd	nd	nd	nd				0.16	0.16	0.16	0.16	0.005	0.16	3.41
Oleico (18:1 n-9)	30.0	29.8	29.9	30.1	0.06	30.0	0.43	23.6	23.2	23.4	23.5	0.17	23.4	0.73	28.2	28.3	28.2	28.3	0.29	28.3	1.03
Poliinsaturados																					
Linoleico (18:2 n-6)	15.3	15.3	15.4	15.4	0.13	15.4	0.38	4.76	4.69	4.70	4.78	0.04	4.72	0.94	15.2	15.0	15.1	15.0	0.17	15.00	1.15
Linolénico (18:3 n-3)	0.96	0.94	0.96	0.95	0.01	0.96	1.00	nd	nd	nd	nd				0.13	0.12	0.13	0.13	0.04	0.13	4.58
Araquidonico (20:4 n-6)	nd	nd	nd	nd				nd	nd	nd	nd				nd	nd	nd	nd			
Total Saturados					51.2			71.9				54.4									
Total Insaturados					46.4			28.1				43.6									
Monoinsaturados					30.1			23.4				28.5									
Poliinsaturados					16.4			4.72				15.1									

^a Expresado como porcentaje total de área de pico; nd: no detectado

En el sistema III la concentración de ácidos grasos saturados disminuye de 55.1% a 54.4 % ($\Delta 0.7\%$) y la de los insaturados de 44.3% a 43.6% ($\Delta 0.7\%$). En estos últimos los mayores cambios se observan en los ácidos grasos poliinsaturados que pasan de 16.3% a 15.1%. La disminución se da principalmente en el ácido linolénico cuya composición vario de 1.13% en la grasa sin interesterificar a 0.13% en la grasa interesterificada.

De acuerdo a la composición inicial de los ácidos grasos y a los cambios observados, podría suponerse que de los tres sistemas analizados, el más susceptible de sufrir reacciones de oxidación es el sistema III. En este sistema se dan cambios importantes en la composición del ácido linolénico, siendo este ácido el más susceptible a sufrir reacciones de oxidación. Según la bibliografía en las reacciones de oxidación la formación de los radicales libres del C₈ y C₁₁ del ácido linolénico requiere menos energía que la necesaria para inducir la formación del radical libre del C₁₁ del ácido Linoleico (75 kcal/mol) y el radical libre C₈ del ácido oleico (50 Kcal/mol). Así, las velocidades de oxidación son en su orden 25:12:1 para el ácido linolénico, linoleico y oleico [Smith S. *et al.*, 2006]

Aardt M. *et al.*, 2004, compararon la estabilidad oxidativa de aceites comestibles (grasa de leche y aceite de oliva) y de triacilglicéridos simples (trilinoleina, trioleina, triestearina), y encontraron que la composición en ácidos grasos determina la estabilidad oxidativa. La trilinoleina al contener 100% de ácido linoleico (C18:2), fue la menos estable, que la trioleina y la grasa de leche y el aceite de oliva que contenía menor porcentaje de este ácido graso (24.6, 71.8 % respectivamente).

Además de la composición inicial de ácidos grasos, las reacciones de interesterificación también influyen en la estabilidad oxidativa de las grasas, como

se demuestra en diferentes estudios realizados sobre el tema. Moussata C. y Casimir A, (1998) por ejemplo, determinaron que la interesterificación enzimática con lipasa de *Pseudomonas* sp. causaba un incremento en la estabilidad oxidativa del aceite de semilla de Melón (rico en ácido graso linoleico) al enriquecerlo en ácido palmítico proveniente de aceite de girasol.

Otros autores como Turan S. *et al.*, (2007); Lee J. *et al.*, (2006); Nielsen N. *et al.*, (2006); Hamam F y Fereidoon s, (2005); en cambio, determinaron que la interesterificación podía disminuir la estabilidad oxidativa de las grasas por la incorporación de ácidos grasos insaturados tanto en reacciones de ácidolisis como en reacciones de transesterificación enzimática, como es la reacción llevada a cabo en este trabajo.

3.2 ÍNDICE DE PERÓXIDO

El valor de peróxido es el método común utilizado para evaluar la estabilidad oxidativa de las grasas y es conveniente para medir la formación de hidroperóxidos en las fases tempranas de la oxidación.

En la **Tabla 4** se muestran los índices de peróxidos expresados en miliequivalentes de O₂ activo por k de grasa, de las mezclas de los aceites vegetales, a diferentes tiempos de reacción. Los coeficientes de varianza (CV) fueron menores de 4.5 %.

Al inicio de la reacción de interesterificación, el sistema **III**, presenta mayor **PV** (1.5 meq/k), que los sistemas **I** (0.8 meq/k) y **II** (0.6 meq/k), esto debido a que el sistema **III** a pesar de tener un contenido total de ácidos grasos insaturados menor que el sistema **I** (44.3%), es el que presenta mayor cantidad de ácido linolénico, siendo este ácido muy susceptible a las reacciones de oxidación.

El sistema **II** presenta el menor **PV** al inicio de la reacción porque como se mostró en el apartado anterior sus constituyentes superestearina de palma-aceite de palmiste, dan origen a una mezcla de aceites con menor proporción de ácidos grasos insaturados y que además no contiene ácido linolénico.

En la **Figura 5** se presenta la evolución del índice de peróxidos con el tiempo, observándose para los sistemas **I** y **III** que el **PV** se incrementa hasta los 120 minutos de reacción (1.4 y 2.1 meq/k, respectivamente), tiempo después del cual disminuye. En el sistema **II** en cambio, el **PV** aumenta con el tiempo durante el proceso de interesterificación (180 minutos), sin presentarse en este caso una inflexión en la tendencia.

La disminución del **PV** en los sistemas **I** y **III** estaría relacionada con la descomposición de los hidroperóxidos formados pasados 120 minutos del proceso de interesterificación.

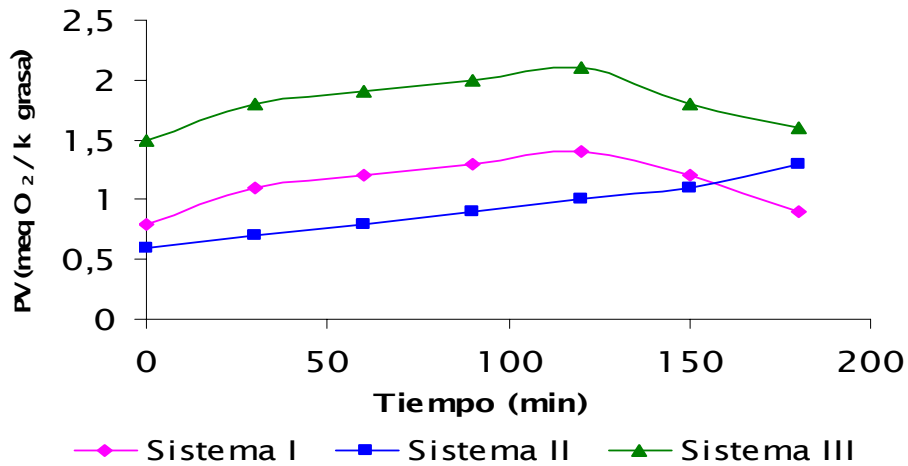
En este rango de tiempo de (120 min), tiempo en el cual se alcanza la máxima concentración de peróxidos, las mezclas de reacción: Estearina de palma-aceite de soya (**I**) y Estearina de palma - aceite de palmiste - aceite de soya (**III**), presentaron igual velocidad de formación de peróxidos (0.005 meq/k grasa).

Tabla 4. Índices de Peróxidos (meq O₂/k grasa) de las grasas Interesterificadas enzimáticamente.

SISTEMA DE REACCIÓN	TIEMPO DE REACCIÓN (min)							
	0	30	60	90	120	150	180	Control a 70°C, 200 rpm
Estearina de palma-Aceite de soya	0.8 ±0.001	1.1 ±0.03	1.2 ± 0.06	1.3 ±0.05	1.4 ±0.0008	1.2 ±0.04	0.9 ±0.01	0.8 ±0.05
Superestearina de palma – Aceite de palmiste	0.6 ±0.002	0.7 ±0.01	0.8 ±0.01	0.9 ±0.02	1.0 ±0.006	1.1 ±0.05	1.3 ±0.05	0.5±0.03
Estearina de palma –Aceite de palmiste – Aceite de soya	1.5 ±0.04	1.8 ±0.007	1.9 ±0.006	2.0 ±0.02	2.1 ±0.08	1.8 ±0.02	1.6 ±0.05	1.2±0.01

Cada valor en la tabla representa la media ± desviación estándar de cuatro determinaciones

Figura 5. Variación del índice de Peróxidos con el tiempo de reacción en la reacción de interesterificación enzimática



El comportamiento del **PV** a lo largo del proceso de interesterificación, en los tres sistemas analizados, puede explicarse, teniendo en cuenta que en el sistema **II** no hay presencia de ácido linolénico, mientras que en los sistemas **I** y **III**, si está presente. El ácido linolénico por tener tres dobles enlaces, requiere menor energía debido a la fuerte influencia de sus dos grupos 1,4-pentadieno que hace altamente reactivos los hidrógenos metilénicos, causando la formación de peróxidos. Estos peróxidos se descomponen más rápido en comparación a los obtenidos a partir del ácido linoleico y del ácido oleico [Smith S. *et al.*, 2006].

Adicional a la presencia de los ácidos grasos insaturados y al efecto de la reacción de interesterificación, condiciones de reacción como la temperatura (70 °C) y la agitación (200 rpm), pueden influir en la estabilidad oxidativa, como se deduce de los resultados obtenidos en el experimento control. En este al final del proceso se alcanzan valores de **PV** representativos.

Similares tendencias en la variación del índice de peróxido con el tiempo han sido encontradas por Nielsen N. *et al.*, (2006), quienes produjeron sustitutos de grasa láctea por interesterificación de aceite de soya y manteca de cerdo, obteniendo valores de **PV** de 2.2 meq/k para el lípido estructurado obtenido al cabo de 3 horas de reacción.

Al emplear aceite de Oliva extra virgen y ácido linoleico conjugado (CLA), Lee *et al.*, (2006), obtuvieron lípidos con **PV** de 2.8 meq/k, mientras que Heinrich M. *et al.*, (2004), al emplear ácido cáprico y ácido linoleico conjugado (CLA) en diferentes proporciones, obtienen productos finales con índices de peróxidos que oscilan entre 0.05 y 0.13 meq/k.

Las dos investigaciones anteriores realizadas en presencia de Lipozyme RM IM difieren en los sustratos utilizados. En el segundo caso se empleó un ácido graso saturado, mientras que en el primer caso el aceite de oliva extra virgen es un sustrato muy rico en ácidos grasos insaturados. Adicionalmente, en el proceso de interesterificación se incorpora ácido linoleico conjugado (42.5%), siendo este un ácido graso muy susceptible a sufrir reacciones de ranciamiento oxidativo.

En el año 2001, Chu B. *et al.*, evaluaron la evolución del **PV**, encontrando para la mezcla inicial de reacción (oleína de aceite de palmiste-estearina de palma) un valor de 0.79 meq/k, valor que disminuyó a 0.55 meq/k después de 6 horas de reacción. Las grasas interesterificadas fueron utilizadas en procesos de fritura, observándose que son más sensibles a la oxidación, que las materias primas originales.

Con enzima Lipozyme TL IM, sólo hay un trabajo reportado y es el realizado por Turan S. *et al.*, (2007) quienes evaluaron la estabilidad oxidativa de lípidos estructurados obtenidos de aceite de soya interesterificado con ácido caprílico, encontrando valores de **PV** altos para el aceite de soya (2.2 meq/k) usado en la reacción y 3.5 meq/k para el lípido estructurado obtenido.

Los anteriores resultados muestran que el **PV** varía dependiendo de los sustratos de reacción, cuando se utiliza en todos los casos interesterificación enzimática.

Los valores de **PV** en todos los casos y a lo largo del proceso de interesterificación evaluado en este trabajo no superaron los máximos permitidos en el Reglamento Sanitario de los Alimentos (2006) en donde se establece que a la fecha de elaboración, el límite máximo de peróxidos es de 2.5 meq de O₂/k de grasa y 10 meq de O₂/k de grasa en su periodo de vida útil. Sin embargo en los trabajos reportados en algunos de ellos si se supera este valor (Nielsen N. *et al.*, 2006; Lee J. *et al.*, 2006; Turan S. *et al.*, 2007).

3.3. ÍNDICE DE *p*-ANISIDINA

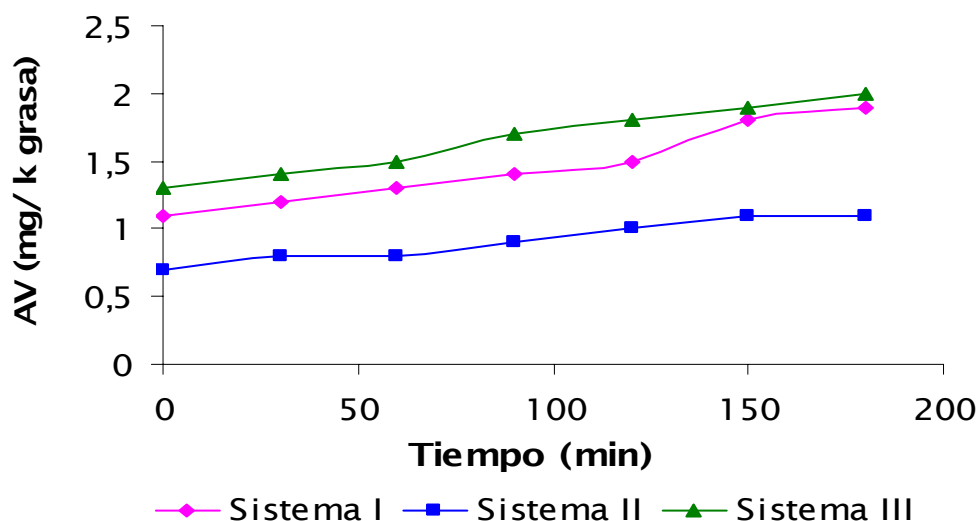
Los resultados del **AV** se realizaron con el fin de determinar la presencia de productos secundarios de oxidación. En la **Tabla 5** se presentan los resultados del índice de *p*-Anisidina. Los coeficientes de varianza (CV) fueron menores de 4.2 %.

Las mezclas de aceites **I** y **III** mostraron valores para **AV** iniciales de 0.9 y 1.1 mg/k, los cuales fueron mayores que los de la mezcla inicial **II** (0.2 mg/k). El

mayor valor lo presenta el sistema III, sistema que también presenta el mayor valor de peróxidos al inicio de la reacción.

La **Figura 6** muestra que la variación del **AV** sigue una tendencia similar en todos los sistemas analizados, a lo largo del proceso.

Figura 6. Variación del índice de *p*-Anisidina en la reacción de Interesterificación Enzimática con el tiempo de reacción



En el caso de los sistemas I y III el incremento en el **AV** es de aproximadamente 0.1 mg/k por cada 30 minutos, hasta alcanzar en el Sistema I 150 minutos de reacción y en el sistema III 90 minutos. A partir de estos tiempos, se da un incremento neto de 0.2 mg/k, es decir, podría decirse que en estos sistemas el periodo de oxidación o la etapa de propagación, se acelera al alcanzar estos tiempos. Los hidroperóxidos formados se descomponen rápidamente originando productos como hidroxiácidos, cetoácidos o aldehídos.

La velocidad relativa de los productos secundarios de oxidación, después de llevarse a cabo la interesterificación, muestra un orden: Sistema **III** estearina de palma aceite de palmiste-aceite de soya (0.005 mg/k) > estearina de palma-aceite de soya (0.004 mg/k) > superestearina de palma aceite de soya (0.003 mg/k). Aún cuando estos cambios son pequeños, es posible establecer que la velocidad de formación de compuestos volátiles secundarios es mayor en el Sistema **III**, seguido del sistema **I**, y del sistema **II**.

Al comparar los resultados anteriores con los obtenidos en la determinación del índice de peróxidos, se observa que el aumento del **AV** coincide en el tiempo con los cambios en la evolución del **PV**. Así, cuando los hidroperóxidos responsables de la oxidación primaria se descomponen formando compuestos carbonilos (aldehídos, cetonas, ácidos de bajo ó medio peso molecular y otros productos oxigenados), se produce una disminución del **PV** y un aumento del **AV**.

Lo anterior corrobora que a lo largo del proceso de oxidación hay periodos de tiempo en que se produce un incremento significativo en la generación de productos primarios y secundarios de oxidación (Véase **Figura 1** del apartado 1).

Al igual con el **PV**, las condiciones de reacción como la temperatura y agitación tienen una influencia importante la formación de los productos secundarios de la oxidación. Los valores de **AV** obtenidos en el control sin enzima son similares a los obtenidos en las muestras tratadas con enzimas.

Tabla 5. Índices de *p*-anisidina (mg/k grasa) de las grasas interesterificadas enzimáticamente

SISTEMA DE REACCIÓN	TIEMPO DE REACCIÓN (min)							
	0	30	60	90	120	150	180	Control a 70°C, 200 rpm
Estearina de palma-Aceite de soya	0.9 ±0.001	1.0 ±0.02	1.1 ± 0.03	1.2 ±0.02	1.3 ±0.03	1.4 ±0.03	1.6 ±0.02	1.1 ±0.05
Superestearina de palma – Aceite de palmiste	0.2 ±0.008	0.4 ±0.01	0.4 ±0.02	0.5 ±0.02	0.7 ±0.01	0.7 ±0.02	0.8 ±0.02	0.8±0.04
Estearina de palma –Aceite de palmiste – Aceite de soya	1.1 ±0.01	1.2 ±0.02	1.3 ±0.03	1.4 ±0.04	1.6 ±0.03	1.8 ±0.04	1.9 ±0.01	1.3±0.01

*Cada valor en la tabla representa la media ± desviación estándar de cuatro determinaciones

En todos los casos los valores de **AV** encontrados se encuentran dentro los aceptados comercialmente para grasas y aceites, en donde se considera que un aceite es de buena calidad si este valor esta por debajo de 2.0 mg/k. En el caso del sistema **III**, sin embargo, el valor de **AV** al final del proceso (1.9 mg/k), está muy cerca al límite superior, lo que indica que puede ser una grasa que una vez utilizada en la elaboración de productos para la industria de alimentos, puede ser muy susceptible a las reacciones de oxidación.

Variaciones en el **AV** durante la reacción de interesterificación también han sido reportadas por otros autores. Chu B. *et al.*, (2005) presenta valores de 0.63 mg/k para muestras control y de 0.71 mg/k para el producto interesterificado, mientras que Lee J. *et al.*, (2004, 2006) presenta variaciones de 8.3 mg/k a 8.6 mg/k y entre 1.2 mg/k y 0.4 mg/k respectivamente para diferentes sustratos.

3.4 COEFICIENTE DE EXTINCIÓN ESPECÍFICA ($E^{1\%}_{1\text{cm}}$ a 269nm)

La oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados produce trienos conjugados, los cuales pueden generar un incremento en la absorción de radiación ultravioleta a 269 nm, por lo tanto, esta prueba se emplea para proporcionar información sobre la calidad de una grasa o aceite.

En la **Tabla 6** se relacionan los cambios en el $E^{1\%}_{1\text{cm}}$ a lo largo de la reacción de interesterificación para todos los sistemas evaluados. Se observa que en todos los casos, este índice se incrementa con el tiempo. Los sistemas **I** y **III** presentaron los mayores valores iniciales $E^{1\%}_{1\text{cm}}$ a 269 nm (0.6 y 0.9, respectivamente), al

igual que la mayor velocidad relativa en el intervalo de tiempo de 180 minutos (0.002). El sistema II presentó un cambio neto menor (0.001).

Tabla 6. Cambios en la extinción específica, $E^{1\%}_{1\text{ cm}}$ a 269 nm en la reacción de Interesterificación

Tiempo de Reacción (min)	Sistema de Reacción		
	I	II	III
0	0.6	0.4	0.9
30	0.7	0.4	1.0
60	0.8	0.4	1.0
90	0.9	0.5	1.1
120	0.9	0.6	1.1
150	0.9	0.6	1.2
180	0.9	0.6	1.3

Lo anterior corrobora lo que se ha venido observando en el análisis del **PV** y del **AV**, la mayor presencia de ácidos grasos poliinsaturados en el sistema **III** lo hace más susceptible a la oxidación, seguido del sistema **I** y finalmente del sistema **II**. Esto es debido principalmente a que el sistema **I** y **III** contiene mayores niveles de ácidos grasos poliinsaturados, que el sistema **II**.

En el año 2001, Chu B. *et al.*, utilizando este parámetro como control de calidad, durante las reacciones de interesterificación encontraron un valor de 0.2 para el

control de la mezcla estearina de palma - aceite de palmiste que se incrementó hasta 0.5 después de 6 horas de reacción. Esta mezcla tiene 72.6% de ácidos grasos saturados y 27.4 de ácidos grasos insaturados, muy similar al Sistema II.

3.5 ÍNDICE DE YODO

El índice de yodo (**IV**) indica el grado de insaturación de las grasas y los aceites. Un decrecimiento en el **IV** puede ser atribuido a la destrucción de los dobles enlaces por la oxidación, escisión y polimerización. En la **Tabla 7**, se presentan los resultados del índice de yodo de las mezclas iniciales de reacción y de las grasas interesterificadas.

Al inicio de la reacción de interesterificación, la mezcla estearina de palma-aceite de soya (**I**), presenta mayor índice de yodo (60.7 mg KI/g), que las mezclas superestearina de palma-aceite de palmiste (24.3 mg KI/g) (**II**) y estearina de palma-aceite de palmiste-aceite de soya (57.1 mg KI/g) (**III**). Estos valores están determinados por la composición de las mezclas en ácidos grasos insaturados.

Después de la reacción en el sistema **II** hay variación en el índice de yodo, debido a que en este sistema se incrementa la concentración de ácidos grasos insaturados, situación que afecta este índice. En los sistemas **I** y **III**, estos índices no presentan una variación significativa, lo cual se atribuye a los leves cambios presentados en la composición de los ácidos grasos insaturados.

Neshawy A. and S.m, A, (2000) reportaron valores de **IV** entre 54.8 y 45.2 mg KI/g en “*shortenings*” basados en mezclas de aceite de palma y estearina de palma,

mezcladas físicamente en diferentes proporciones. Para el aceite de palma puro el **IV** fue 54.8 mg KI/g. Este IV disminuyó en la medida en que se fue aumentando el nivel de saturación por la adición de estearina de palma.

Una situación similar pero modificando los ácidos grasos por interesterificación enzimática fue encontrada por Chu B. *et al.*, (2001) y Lee *et al.*, (2004) en cuyas investigaciones los **IV** variaron de 29.0 a 31.4 mg KI/g y de 141 a 134 mg KI/g para las mezclas iniciales y las grasas modificada, respectivamente.

Tabla 7. Índices de yodo de las materias primas utilizadas y de las grasas ininteresterificadas enzimáticamente

Sistema de Reacción	Índice de Yodo Sin Modificación	Índice de Yodo Modificación
Estearina de Palma - Aceite de Soya	60.7	60.6
Superestearina de Palma - Aceite de palmiste	24.3	24.4
Estearina de Palma - Aceite de Soya – Aceite de Palmiste	57.1	56.9

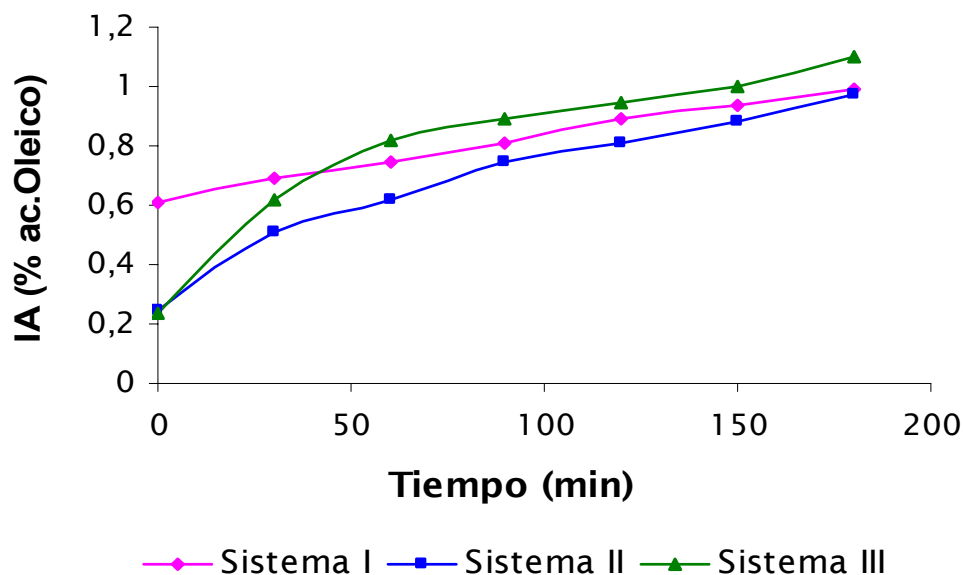
3.6 ÍNDICE DE ACIDEZ

Los ácidos grasos libres, pueden provenir de una rancidez hidrolítica natural o porqué durante la reacción de interesterificación enzimática puede ocurrir

paralelamente una reacción de hidrólisis y parte de los ácidos grasos no se acomodan, pudiendo medirse como ácidos grasos libres.

En este trabajo durante la reacción con la enzima, el **IA** se incrementa con el tiempo (**Figura 7**), teniéndose al final de la reacción valores de 0.99, 0.97 y 1.1 % para los sistemas **I**, **II** y **III**, valores que se encontraron cercanos al límite máximo de 1.0 % aceptado para los aceites, según los estándares internacionales de la Unión Europea y los Estados Unidos. Por lo que se requiere que los productos sean neutralizados, en una etapa posterior.

Figura 7. Variación del índice de acidez en la reacción de interesterificación enzimática con el tiempo de reacción



El efecto de las condiciones de reacción sobre el valor del índice de acidez fue nulo, los valores de índice de acidez no variaron en el control.

3.7 DETERMINACIÓN DEL PERÍODO DE INDUCCIÓN POR EL MÉTODO RANCIMAT

La oxidación de una grasa o un aceite ocurre en dos etapas: un período de inducción en el que la oxidación tiene lugar lentamente y a una velocidad relativamente uniforme, y una segunda etapa en la que hay un aumento rápido de la oxidación. De esta manera la duración del periodo de inducción se puede tomar como una medida de su resistencia a la oxidación.

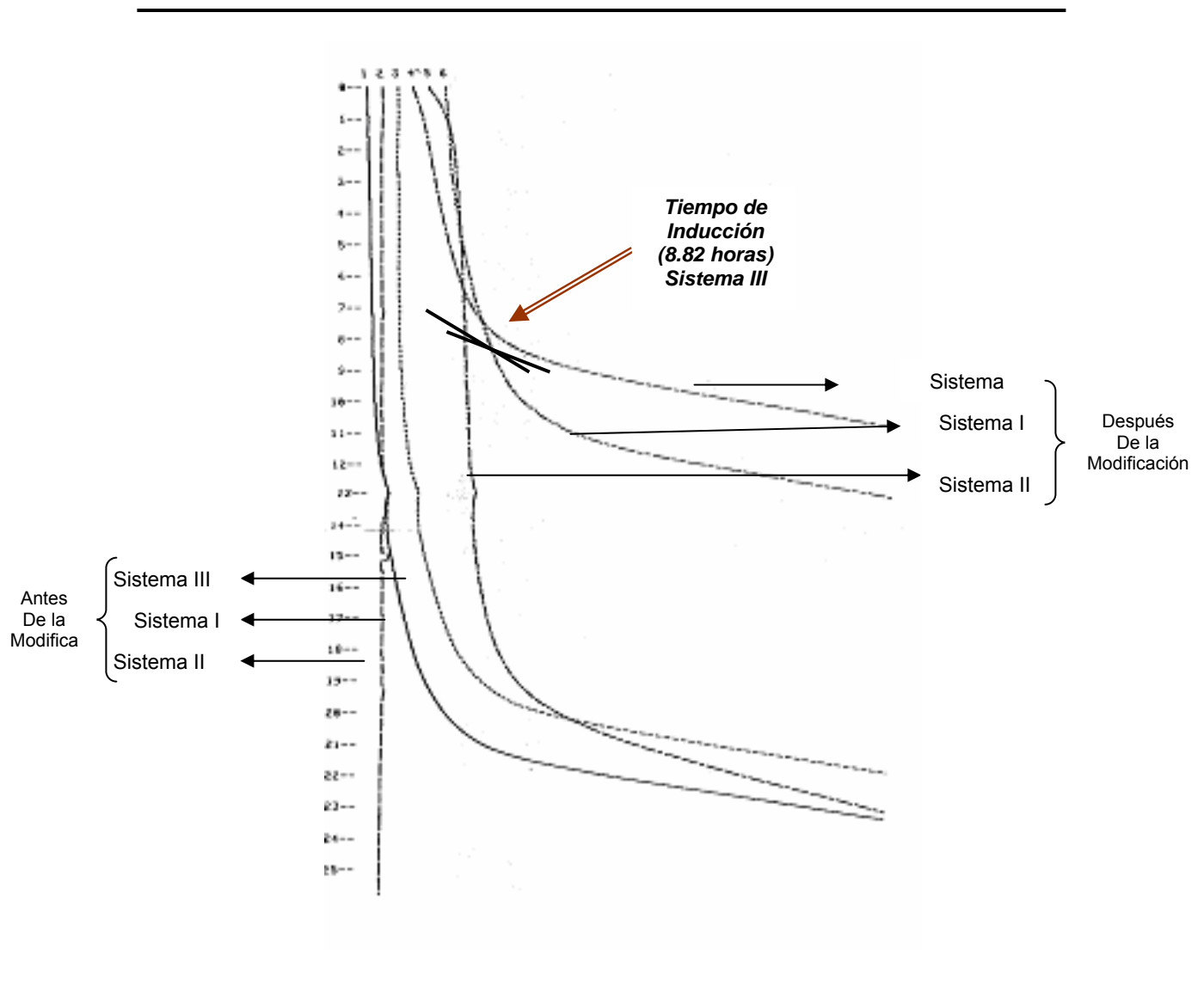
En la **Figura 8**, se muestran las curvas obtenidas, por el método rancimat, para las mezclas vegetales originales (señaladas en la figura 7 como 1, 2 y 3) y las grasas producidas después de la modificación enzimática (señaladas en la figura 7 como 4, 5 y 6). A partir de estas curvas se calcularon los tiempos de inducción que se presentan en la **Tabla 8**.

Tabla 8. Tiempo de Inducción determinado por el rancimat

Sistema de Reacción	Tiempo de Inducción (h) Antes de la Modificación	Tiempo de Inducción (h) Después de la Modificación
Estearina de Palma - Aceite de Soya	21.4	11.2
Superestearina de Palma - Aceite de palmiste	47.1	20.3
Estearina de Palma - Aceite de Soya – Aceite de Palmiste	20.0	8.82

El sistema II, superestearina de palma – aceite de palmiste, presenta un tiempo de inducción inicial 2.2 a 2.3 veces mayor que el tiempo de inducción de los sistemas I y III, lo cual significa que como mezcla de reacción, es mucho más estable ante las reacciones de oxidación. Comparada con la mezcla de reacción I, la mezcla de reacción III presenta menor tiempo de inducción porqué contiene mayor cantidad de ácido linolénico.

Figura 8. Curvas experimentales obtenidas en el periodo de inducción



Lo anterior muestra que ligeros cambios en la composición de ácidos grasos inciden en el tiempo de inducción de la grasa y por lo tanto en su estabilidad.

La interesterificación también afecta el comportamiento de la grasa en condiciones de oxidación, en los tres casos evaluados el tiempo de inducción disminuyó en promedio un 50% respecto al tiempo inicial.

El efecto de la reacción sin embargo, no fue el mismo. Para el sistema I, por ejemplo, la disminución del tiempo de reacción fue del orden de 47.7%, mientras que para el Sistema II y III fue de 56.9% y 55.9%. El mayor efecto observado en el sistema II, puede estar relacionado con el hecho de que en este sistema es donde se presentó el mayor cambio en el contenido de ácidos insaturados.

De los tres productos interesterificados evaluados el menos estable de todos fue el obtenido del sistema III. Le siguen los productos del Sistema I y el Sistema II. Esto significa que las grasas modificadas o los productos elaborados con ellas requieren una adición mayor de antioxidantes para evitar su deterioro durante el almacenamiento

Moussata C. y Casimir A,(1998) reportaron que el tiempo de inducción para el aceite de melón (4.55 h), aceite de girasol alto oleico (10.70 h) y de su mezcla física (8.8 h) disminuyó al ser interestrificada con lipasa de *Pseudomonas* sp. (PS30) (5.3 h), demostrando que el aceite de girasol alto oleico fue el más estable y el aceite de melón el menos estable a las reacciones de oxidación. Este es un caso en el cual se aumenta la estabilidad del aceite del melón por la incorporación

de ácidos grasos saturados y se disminuye la estabilidad del aceite de girasol por la incorporación de ácidos 18:1 n-9, 18:2n-6 provenientes del aceite de melón. En otro caso muy extremo, Lee *et al.*, (2006), miden tiempos de inducción de 42.3 horas para el aceite de oliva extra virgen y de 1.9 horas para el lípido estructurado obtenido de la acidólisis con CLA en presencia de Lipozyme RM IM. La incorporación de éste ácido contribuye a disminuir apreciablemente la estabilidad oxidativa.

Daniels R. *et al.*, (2006), evaluaron la interesterificación química del aceite de soya con metóxido de sodio y encontraron que la redistribución en este caso al azar de los ácidos grasos libres, también afecta la estabilidad oxidativa de los productos interesterificados. Las condiciones de reacción utilizados en este sistema son más altas (100 °C) que las usadas en la interesterificación enzimática (70 °C). Los tiempos de inducción variaron de 4.2 horas para el aceite de soya original a 1.1 hora para el aceite interesterificado.

Recientemente, Turan S. *et al.*, (2007), reportaron que el tiempo de inducción del aceite de Soya disminuía al ser interesterificado con ácido caprílico en presencia de Lipozyme TL IM, de 8.4 horas a 5.8 horas. Estos investigadores concluyeron que la incorporación de los ácidos grasos saturados en el aceite de soya no parece incrementar la estabilidad oxidativa del SL, porque la concentración de ácidos grasos poliinsaturados sigue siendo alta.

Llama la atención que los tiempos de inducción obtenidos para las mezclas de reacción evaluadas y los productos interesterificados obtenidos, fueron en todos los casos superiores a los reportados por los autores mencionados anteriormente. Lo anterior muestra que a pesar de que la interesterificación disminuye el tiempo

de inducción, son grasas relativamente más estables que aceites vegetales como el aceite de soya, de girasol, etc.

Finalmente puede establecerse que los métodos de análisis índice de peróxido, Índice de *p*-anisidina, coeficiente de coeficiente de extinción específica ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$ a 269nm), índice de yodo, permiten establecer que durante la reacción de interesterificación, hay cambios en la estabilidad oxidativa del aceite. Sin embargo, el método más recomendado para predecir esta estabilidad, pensando en el uso posterior de las grasas especiales, es el método rancimat.

CONCLUSIONES

- De este estudio se concluye que la estabilidad oxidativa de las grasas interesterificadas enzimáticamente es menor a la de las mezclas iniciales, estableciéndose un orden de estabilidad: superestearina de palma – aceite de palmiste (Sistema II) > estearina de palma - aceite de soya (Sistema I) > estearina de palma- aceite de soya –aceite de palmiste (Sistema III).
- La estabilidad oxidativa de las grasas ésta determinada por su composición en ácidos grasos y las condiciones de reacción. El Sistema III por tener mayor concentración de ácido linolénico es la mezcla de aceites más afectada por los procesos de oxidación.
- En los sistemas grasos II y III, se observa un aumento en la concentración relativa de ácidos grasos saturados, después de la interesterificados enzimáticamente, En el caso de los ácidos grasos insaturados, sólo se observo un cambio en su concentración relativa, en el sistema III al finalizar de la reacción.
- La variación en los índices de peróxido, índice de *p*-anisidina, índice de acidez e índice de yodo, permiten ver los cambios generados en la estabilidad de las grasas, sin embargo la prueba de rancimat es mas contundente para predecir la estabilidad de la grasa en anaquel.

- Las grasas interesterificadas presentan valores de índices de peróxido, índice de *p*-anisidina, índice de acidez que se encuentran dentro de los rangos establecidos por las Normas Internacionales, sin embargo el Sistema III, presenta **AV** cercanos a los niveles superiores permitidos.

- Los tiempos de inducción obtenidos para los sistemas evaluados son mayores que los reportados en la literatura para aceites vegetales puros o mezclas, sin embargo, las grasas interesterificadas requieren la adición de antioxidantes previo a su uso a escala industrial como grasas especiales.

BIBLIOGRAFÍA

1. **AMADO, M, y RODRÍGUEZ, E.** Estudio de la obtención de ésteres etílicos por transesterificación, usando lipasa inmovilizada de *Thermomyces lanuginosus*, Tesis de grado, 2006, *Universidad Industrial de Santander*, Bucaramanga, Colombia.
2. **AARDT, M; DUNCAN, S; LONG, T; KEEFE, S; MARCY, J. and SUSAN, S.** Effect of antioxidants on oxidative stability of edible fats and oils: Thermogravimetric Analysis. En: *J. Agric. Food. Chem.*, **52**, 2004, pp. 587-591.
3. **APARICIO, R. and APARICIO, R.** Authentication of vegetable oils by chromatographic techniques. En: *Journal of Chromatography A.*, **881**, 2000, pp. 93-104.
4. **ARANGO, L;** Producción a escala de planta piloto de productos equivalentes de la manteca de cacao a partir de la oleina de palma por Interesterificación enzimática, Tesis Posgrado, 2004, *Universidad Industrial de Santander*, Bucaramanga, Colombia.
5. **BARRERA, D. and BLOCK, J.** Ácidos grasos *trans* en aceites hidrogenados: implicaciones técnicas y nutricionales. En: *Grasas y Aceites.*, **44** (4-5), 1993, pp. 286-291.
6. **BADUI, S.** Química de los alimentos. Longman de México editores, México, 1996, pp. 247-254.

7. **BERNAL, I.** Análisis de alimentos. Guadalupe. 2^{sd} ed. Colombia, 1994, pp. 158-161.
8. **BERMÚDEZ, A.** Lípidos diseñados para consume humano y estabilidad. En: *Lípidos y salud*, **4** (2), 2003, pp. 1-4.
9. **CHU, B; GHAZALI, H; LAI, O; MAN, Y; YUSOF, S. and YOSOFF, M.** Performance of a lipase-catalyzed transesterified palm kernel olein and palm stearin blend in frying banana chips. En: *Food chemistry*, **47**, 2001, pp. 21-33.
10. **DANIELS, R; KIM, H. and DAVID, M.** Hydrogenation and interesterification effects on the oxidative stability and melting point of soybean oil. En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**, 2006, pp. 6011-6015.
11. **DÍAZ, O. and LUIS, G.** Consistencia de lípidos estructurados a partir de aceite de pescado y grasa de palmaste. En: *Grasas y Aceites*, **54** (2), 2003, pp. 122-129.
12. **DÍAZ, O. and GIOIELLI, L.** Lípidos estructurados obtenidos por interesterificación química y enzimática a partir de aceite de pescado y grasa de palmiste. *Grasas y Aceites*, **54** (2), 2003, pp. 161-168.
13. **DOBARGANES, M; RÍOS, J. and PÉREZ, M.** Relaciones entre la composición de aceites vegetales y los componentes volátiles producidos durante la termoxidación. En: *Grasas y Aceites*, **37** (29), 1995, pp. 61-67.
14. **FAO/OMS** Grasas y aceites en la nutrición humana. (Estudio de FAO Alimentación y Nutrición, **57**, Roma, 1997.

15. **GARCÍA, L; GARCÍA L; ROJOS, D. and ELSA, G.** Plantas con propiedades Antioxidantes. En: *Rev Cubana Invest Bioméd*, **20** (3), 2001, pp. 231-235.
16. **GHOTRA, B.; DYAL, S. and SURESH, N.** Lipid shortenings: a review. En: *Food Research International*, **35**, 2002, pp. 1015-1048.
17. **GONZAGA, F. and CELIO, P.** A new method for determination of the oxidative stability of edible oils at frying temperatures using near infrared emission spectroscopy. En: *Analytica Chimica Acta*, **570**, 2006, pp. 129-135.
18. **GROMPONE, M.** El índice de anisidina como medida del deterioro latente de un material graso. En: *Grasas y aceites*, **42** (1), 1991, pp. 8-13.
19. **GROMPONE, M.** Propiedades de los aceites vegetales modificados por hidrogenación, interesterificación y fraccionamiento. En: *Grasas y Aceites*, **43** (6), 1992, pp. 330-334.
20. **GROMPONE, M.** oxidación De los lípidos. Teorías y aplicaciones. XI Congreso latinoamericano de *Grasas y Aceites*, 2005.
21. **GUILLÉN, M. and NEREA, C.** Fourier transform infrared spectra data versus peroxide and anisidine values to determine oxidative stability of edible oils. En: *Food chemistry*, **77**, 2002, pp. 503-510.
22. **HAMAM, F. and FERREIDON, S.** Enzymatic incorporation of capric acid into a single cell oil rich in docosahexaenoic acid and docosapentaenoic acid and oxidative stability of the resultant structured lipid. En: *Food chemistry*, **91**, 2005, pp. 583-591.

23. **HAMAM, F. and FEREIDOON, S.** Acydolysis reactions lead to esterification of endogenous tocopherols and compromised oxidative stability of modified oils. En: *J agric Food Chem*, **54**, 2006, pp. 7319-7323.
24. **HEINRICH, M; NIELSEN, N; XU, X. and CHARLOTTE, J.** Oxidative stability of structured lipids containing C18:0, C18:1, C18:2, C18:3 or CLA in sn2-position-as bulk lipids and in milk drinks. En: *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, **5**, 2004, pp. 249-261.
25. **HIDALGO, F.; ZAMORA, R. and ALAIZ, M.** Modificaciones producidas en las proteínas alimentarias por su interacción con lípidos peroxidados. I. Química radicalaria de los ácidos grasos poliinsaturados. En: *Grasas y Aceites*, **42** (5), 1999, pp. 379-386.
26. **HOTCHKISS, P.** Food Science, 5th ed. London, New York, 1997, pp. 359-375.
27. **HUNTER, J.** Dietary levels of *trans*-fatty acids: basis for health concerns and industry efforts to limit use. En: *Nutrition research*, **25**, 2005, pp. 499-513.
28. **IWASAKI, Y. and TSUNEO, Y.** Enzymatic synthesis of structured lipids. En: *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **10**, 2000, pp. 129-140.
29. **KAIRUZ, L.** Introducción al estudio de la composición de los alimentos, ed. Guadalupe, Colombia, 2002, pp. 151-158.

30. **KELLENS, M. and ANTWERP, B.** Desarrollos en la tecnología de modificación de grasas “Interesterificación de grasas y aceites”. En: *Grasas y aceites*, 1997, pp. 401-421.
31. **LEE, J; LEE, K; AKOH, C; CHUNG, S. and MEE, K.** Antioxidant evaluation and oxidative stability of Sstructured lipids from extravirgin olive oil and conjugataed linoleic Acid. En: *J Agric Food Chem*, **54**, 2006, pp. 5416-5421.
32. **LEE, J; SHIN, J; LEE, J; LEE, K.** Production o lipase-catalyzed structured lipids from safflower oil with conjugated linoleic acid and oxidation studies with rosemary extracts. En: *Food Research International*, **37**, 2004, pp. 967-974.
33. **LEE, Y; OH, S; CHANG, J. AND IN-HWAN, K.** Chemical composition and oxidative stability of safflower oil prepared from safflower seed roasted with different temperatures. En: *Food chemistry*, **84**, 2004, pp.1-6.
34. **MILLER.** Química de los alimentos, manual de laboratorio, ed. Limusa Wiley, 2001, pp. 72-75.
35. **MONDELLO, L; TRANCHIDA P; DUGO, P. and GIOVANNI D.** Rapid, micro-scale preparation and very fast gas chromatographic separation of cod liver oil fatty acid methyl esters. En: *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2006.
36. **MORENO, C. and LARRAURI J.** Principales métodos para la determinación de la oxidación lipídica. En: *Food Sci tech Int*, **4** (6), 1998, pp. 391-399.

37. **MORENO, N. y DURÁN, T.** Evaluación de la variación del perfil ácido del grano de cacao durante los procesos de fermentación y de secado, Tesis de grado (Químico). (1999), *Universidad Industrial de Santander*, Bucaramanga, Colombia.
38. **MORENO, N; PEREA, A; CRISTIAN M.** Modificación de aceites vegetales con lipasas microbianas para la obtención de alimentos. XI Congreso latinoamericano de grasas y aceites, 2005.
39. **MORENO, N; MARTÍNEZ, F. and AIDÈ PEREA.** Grasas a la medida con lípidos estructurados obtenidos por interesterificación enzimática. IX conferencia internacional sobre ciencia y tecnología de alimentos, 2005.
40. **MORENO, N.** Búsqueda de nuevas alternativas para la utilización del Aceite de Palma: Producción de equivalentes de la manteca de cacao por Interesterificación enzimática, Tesis de maestría. (2001). *Universidad Industrial de Santander*, Bucaramanga, Colombia.
41. **MOUSSATA, C. and CASIMIR, A.** influence of Lipase-Catalyzed Interesterification on the Oxidative Stability of Melon Seed Oil Triacylglycerols. En: *JAACS*, **75** (9), 1998, pp. 1155-1159.
42. **MU, H. and TRINE, P.** The metabolism of structured triacylglycerols. En: *Progress in Lipid Research*, **44**, 2005, pp. 430-448.
43. **NAZ, S; SHEIKH, H; SIDDIQI, R; SYED, S.** Deterioration of live, corn and soybean oils due to air, light, heat and deep-frying. En: *Food Research International*, **38**, 2005, pp. 127-134.

44. **NAZ, S; SHEIKH, H; SIDDIQI, R; SYED, S.** Oxidative stability of olive, corn and soybean oil under different conditions. En: *Food chemistry*, **88**, 2004, pp. 253-259.
45. **NESHAWY, A. and S.M, A.** Improving the quality and oxidative stability of vegetable oil shortening using fermented dairy products and wheat gluten. En: *Food chemistry*, **77**, 2000, pp. 57-60
46. **NIEBLAS, M.; BURGUEÑO, M. y MORENO, L.** Evaluación oxidativa de las mezclas de aceites de leguminosas del Desierto de Sonora con aceites de maíz y soja durante su almacenamiento. En: *Grasas y Aceites*, **52** (6), 2001, pp. 355-362.
47. **NIEBLAS, M.; BURGUEÑO, M. y MORENO, L.** Índices de oxidación en aceites de algunas leguminosas del desierto sonorense. En: *Grasas y aceites*, **52** (1), 2001, pp. 5-9.
48. **NIELSEN, N; YIANKUI, Y; XUEBING, X. and CHARLOTTE, J.** Production and oxidative stability of a human milk fat substitute produced from lard by enzyme technology in a pilot packed-bed reactor. En: *Food chemistry*, **94**, 2006, pp. 53-60.
49. **NIKI, E; YOSHIDA, Y; SAITO, Y. and NORIKI, N.** Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects. En: *Biochemical and Biophysical Research communications*, **338**, 2005, pp. 668-676.
50. **OSBORN, H. and CASIMIR, A.** Effects of α -tocopherol, β -carotene, and Soy Isoflavones on Lipid Oxidation of Structured lipid-Base Emulsions. En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51** (23), 2003, pp.6856-6859.

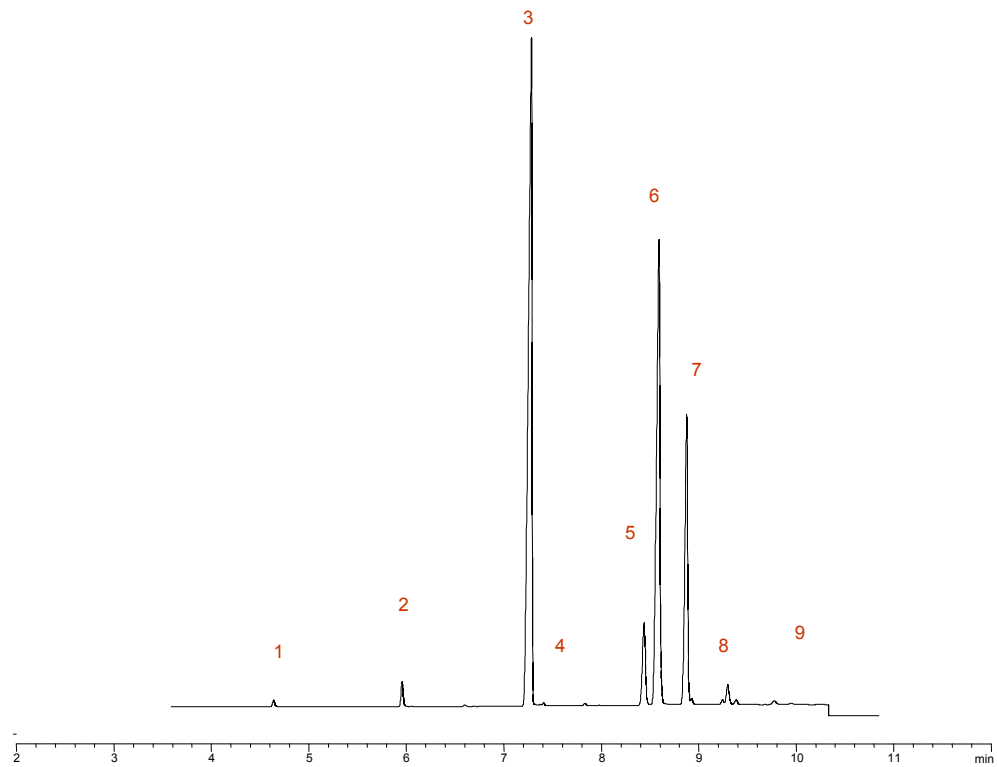
51. **OSORIO, M.** Reglamento Sanitario de Alimentos. En: *InduAlimentos*, **9** (7), 2006.
52. **PARK, J. and DONG-SUN, L.** Detection of Adulteration on Olive Oils Using Triacylglycerols Compositions by High Temperatura Gas Chromatography. En: *Bull. Korean Chem Soc*, **24** (4), 2003). pp. 527-529.
53. **PRIMO, E.** Química de los alimentos, editorial síntesis, España. (1998). p. 192-226.
54. **RODRÍGUEZ, R.** Determinación de aldehídos volátiles en aceites comestibles, por microextracción en fase sólida en el modo *headspace*. Tesis de grado (Químico). (2005), *Universidad Industrial de Santander*, Bucaramanga, Colombia.
55. **RUDNIK, E; SZCZUCINSKA, a; GWARDIAK, a; SZULC, A. and WINIARSKA, A.** Comparative studies of oxidative stability of linseed oil. En: *Thermochimica Acta*, **370**, 2001, pp. 135-140.
56. **SCHUCHARDF, U; SERCHELI, R. and MARTHEUS, V.** Transesterification of Vegetable Oils: a Review. En: *J Braz Chem*, **9** (1), 1998, pp. 199-210.
57. **SMITH, S; KING, R. and DAVID, M.** Oxidative and thermal stabilities of genetically modified high olei sunflower oil. En: *Food chemistry*, 2006.
58. **SOLÍS, J. and MANUEL, Z.** Evaluación del proceso de oxidación de la nuez de la palma aceitera (*Elaeis guineensis*). En: *Agronomía Costarricense*, **19** (2), 1995, pp. 53-58.

59. **TIAN, K. and PURNENDU, D.** Determination of Oxidative Stability of Oils and Fats. En: *Anal Chem*, **71** (9), 1999, pp. 1692-1698.
60. **TURAN, S; IHSAN, K. and HALIL, V.** Influence of sn-1, 3-lipase-catalysed interesterification on the oxidative stability of soybean oil-based structured lipids. En: *Journal Sci Food Agric*, **87**, 2007, pp.90-97.
61. **VALENZUELA, A; SANBUEZA, J. and SUSANA, N.** El uso de lípidos estructurados en la nutrición: una tecnología que abre nuevas perspectivas en el desarrollo de productos innovadores. En: *Rev Chil nutr*, **29** (29), 2002, pp. 106-115
62. **VELASCO, J; ANDERSEN, M. and LEIF, S.** Evaluation of oxidative stability of vegetable oils by monitoring the tendency to radical formation. A comparison of electron spin resonance spectroscopy with the Rancimat method and differential scanning calorimetry. En: *Food Chemistry*, **85**, 2004, pp. 623-632.
63. **ZAMORA, R; HIDALGO, F. and ALAIZ, M.** Alteraciones bioquímicas de los lípidos en los alimentos vegetales. II. Metabolismo de los hidroperóxidos lipídicos. En: *Grasas y Aceites*, **42** (3), 1991, pp. 230-238.

ANEXOS

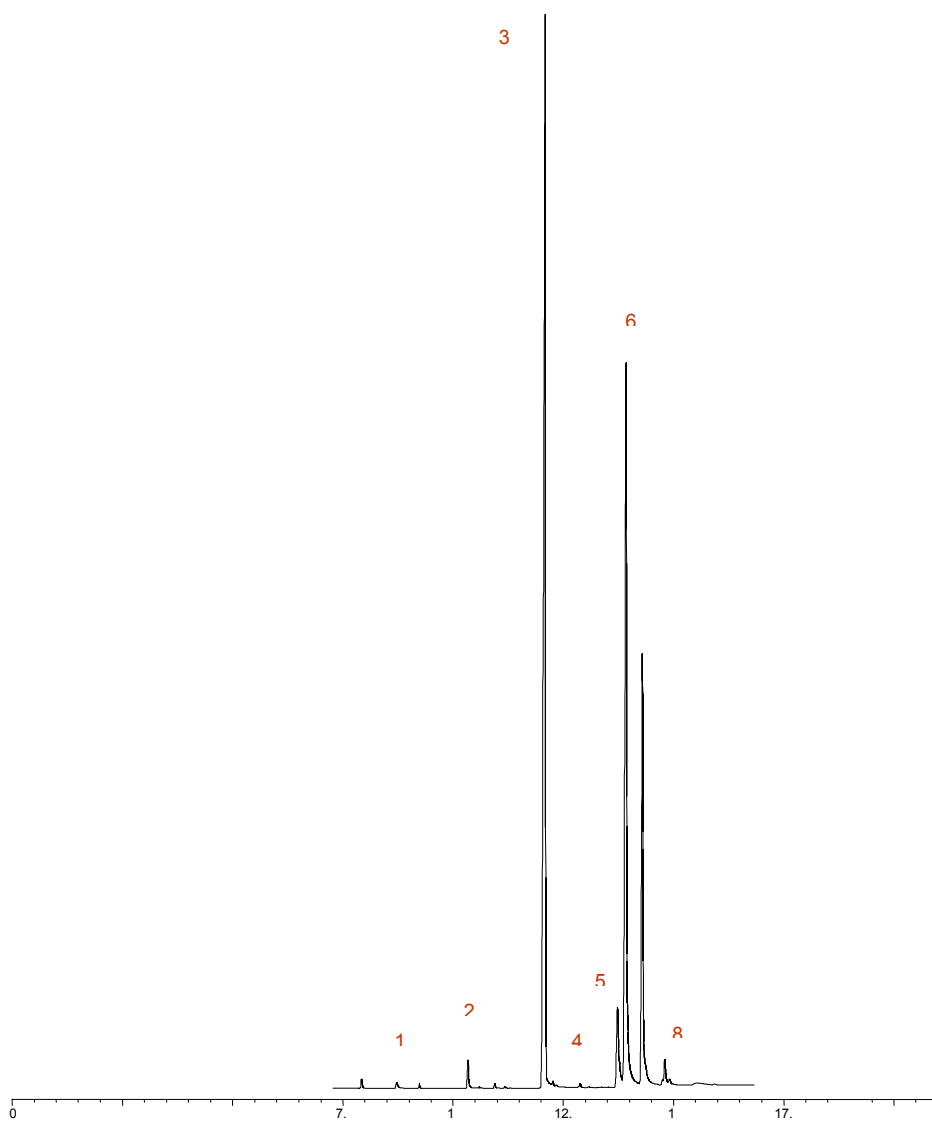
Anexo A. Perfil cromatográfico del sistema Estearina de Palma – Aceite de Soya antes de la Interesterificación enzimática.

1-Laúrico; 2-Mirístico; 3-Palmítico; 4-Palmitoleico; 5-Esteárico; 6- Oleico; 7-Linoleico; 8- Linolénico; 9-Araquidónico; empleando un cromatógrafo de gases marca Agilent modelo HP-6890 Series GC System.



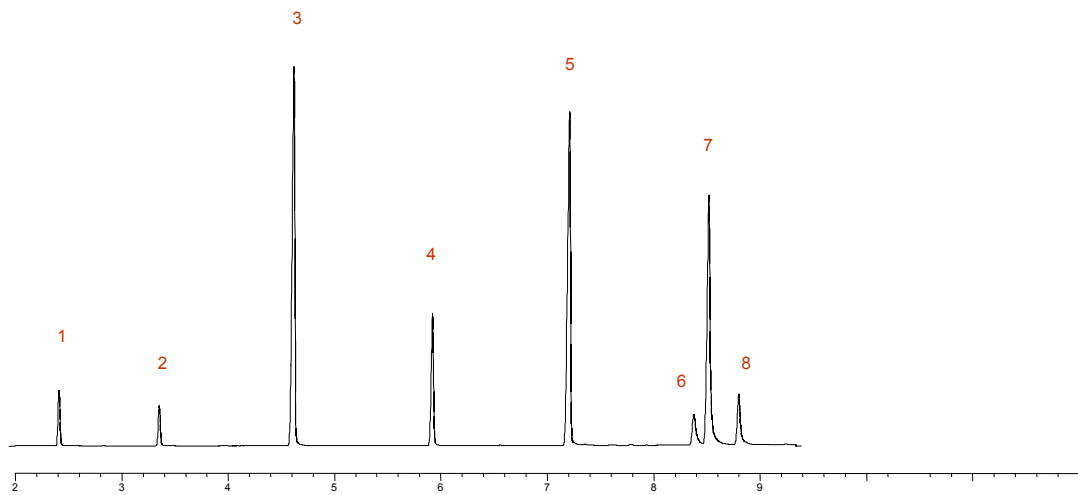
Anexo B. Perfil cromatográfico del sistema Estearina de Palma – Aceite de Soya después de la Interesterificación enzimática.

1-Laúrico; 2-Mirístico; 3-Palmítico; 4-Palmitoleico; 5-Esteárico; 6- Oleico; 7-Linoleico; 8- Linolénico; empleando un cromatógrafo de gases marca Agilent modelo HP-6890 Series GC System.



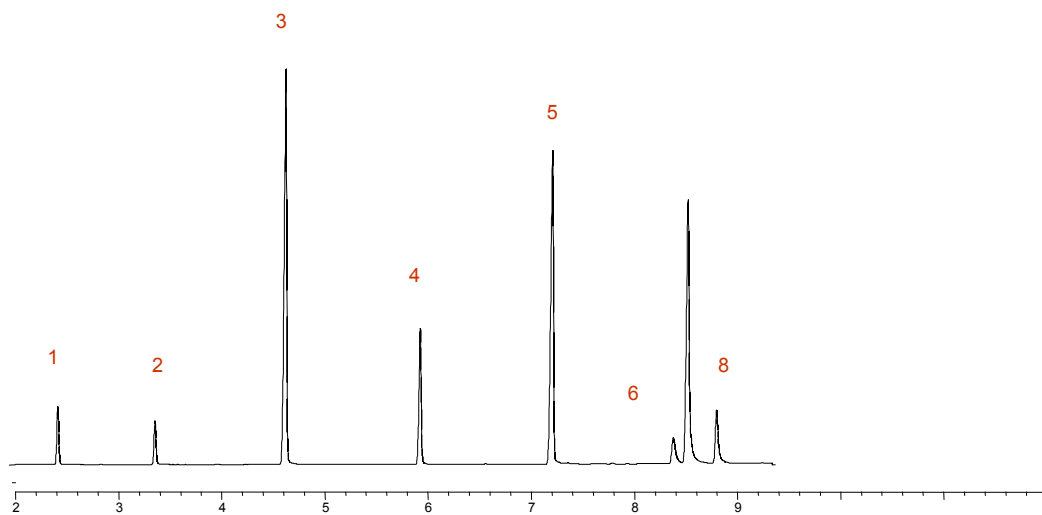
**Anexo C. Perfil cromatográfico del sistema Superestearina de Palma –
Aceite de Palmiste antes de la Interesterificación enzimática.**

1-Caprico; 2-Caprílico; 3-Laurico; 4-Mirístico; 5-Palmítico; 6-Esteárico; 7-Oleico; 8-Linoleico; empleando un cromatógrafo de gases marca Agilent modelo HP-6890 Series GC System.



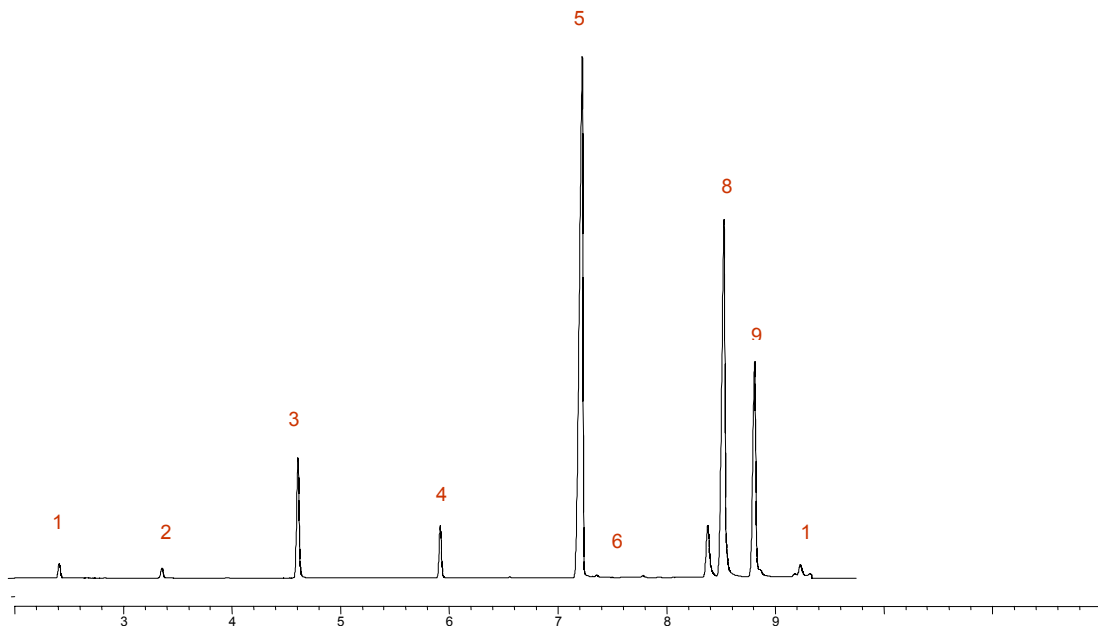
Anexo D. Perfil cromatográfico del sistema Superestearina de Palma – Aceite de Palmiste después de la Interesterificación enzimática

1-Caprico; 2-Caprílico; 3-Laurico; 4-Mirístico; 5-Palmítico; 6-Esteárico; 7-Oleico; 8-Linoleico; empleando un cromatógrafo de gases marca Agilent modelo HP-6890 Series GC System.



Anexo E. Perfil cromatográfico del sistema Estearina de Palma – Aceite de Soya – Aceite de Palmiste antes de la Interesterificación enzimática:

1-Caprico; 2-Caprílico; 3-Laurico; 4-Mirístico; 5-Palmitico; 6-Palmitoleico; 7-Esteárico; 8-Oleico; 9-Linoleico; 10-Linolénico; empleando un cromatógrafo de gases marca Agilent modelo HP-6890 Series GC System.



Anexo F. Perfil cromatográfico del sistema Estearina de Palma – Aceite de Soya – Aceite de Palmiste después de la Interesterificación enzimática:

1-Caprílico; 2-Laurico; 3-Mirístico ;4-Palmítico; 5-Palmitoleico; 6-Estearico; 7-Pleico; 8-Linoleico; 9-Linolénico; empleando un cromatógrafo de gases marca Agilent modelo HP-6890 Series GC System.

