

**DETERMINACIÓN DE ALDEHÍDOS VOLÁTILES EN ACEITES
COMESTIBLES, POR MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA EN EL
MODO *HEADSPACE***

RAÚL HERNANDO RODRÍGUEZ QUINTANILLA

Trabajo de Grado presentado como
requisito parcial para optar al título
de Químico

Directora:

ELENA E. STASHENKO, Química, Ph. D.

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA

Laboratorio de Cromatografía, CIBIMOL

BUCARAMANGA

2005

A mi Madre

AGRADECIMIENTOS

A los profesores Jairo René y Elena Stashenko por sus aportes en el desarrollo del trabajo.

A mis compañeros de laboratorio y amigos.

A Moncha...

A los estudiantes caídos en la lucha contra la tiranía.

A todos aquellos quijotes de nuestro pueblo que aun persisten en la construcción de una patria libre y digna.

ABREVIATURAS

C14:0	Ácido mirístico
C16:0	Ácido palmítico
C16:1	Ácido palmitoleico
C18:0	Ácido esteárico
C18:1	Ácido oleico
C18:2	Ácido linoleico
C18:3	Ácido linolénico
C20:4	Ácido araquidónico
ECD	Detector de captura de electrones
FAME's	Metilésteres de ácidos grasos
FID	Detector de ionización en llama
GC	Cromatografía de gases
GC-ECD	Cromatografía de gases con detector de captura de electrones
GC-FID	Cromatografía de gases con detector de ionización en llama
GC-MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
HS	Espacio de cabeza (HS, por sus siglas en inglés)
I-FABP	Proteína enlazante de ácidos grasos intestinales
kJ/g	Kilojulios por gramo
MDA	Malondialdehído
MS	Espectrometría de masas
PA	Poli(acrilato)
PDMS	Poli(dimetilsiloxano)
PDMS-DVB	Poli(dimetilsiloxano) divinil benceno
PFPH	Pentafluorofenilhidracina
PV	Valor de peróxido
rpm	Revoluciones por minuto
ROOH	Hidroperóxido alquílico

S.A.	Sociedad anónima
SPME	Microextracción en fase sólida
TBA	Ácido tiobarbitúrico
NMC	Nivel mínimo de cuantificación
NMD	Nivel mínimo de detección
%CV	Porcentaje de error (coeficiente de variación, %)

LISTA DE TABLAS

- Tabla 1.** Ácidos grasos más comunes en aceites.
- Tabla 2.** Contenido energético de constituyentes de alimentos.
- Tabla 3.** Algunos compuestos carbonílicos volátiles, productos de la oxidación térmica de linoleato y linolenato. Los aldehídos subrayados son objeto de seguimiento en este estudio.
- Tabla 4.** Resultados de la encuesta realizada, para seleccionar los aceites a evaluar su degradación térmica.
- Tabla 5.** Información suministrada por el fabricante de cada uno de los aceites seleccionados en este estudio.
- Tabla 6.** Composición de ácidos grasos, en forma de sus FAME`s, de los aceites seleccionados.
- Tabla 7.** Cantidad relativa (%) de metilésteres de ácidos grasos en aceite vegetales de la marca Premier. Aceite usado como matriz para la elaboración de la curva de calibración.
- Tabla 8.** Coeficientes de correlación entre la concentración de las soluciones oleosas usadas para la calibración y, la respectiva respuesta del ECD, a cada uno de los aldehídos derivados.
- Tabla 9.** NMD y NMC, determinados por CG-ECD, de los derivados hidrazónicos de los aldehídos estudiados.
- Tabla 10.** Relación entre el contenido del hexanal y del ácido linoleico estudiados.
- Tabla 11.** Coeficientes de correlación (r^2) lineal y cuadrático entre las variables estudiadas, concentración del aldehído y tiempo de calentamiento, para los aceites Andaluz, Búcaro, Olecali y Oliosoya.
- Tabla 12.** Coeficientes de correlación (r^2) entre los resultados obtenidos por diferentes métodos usados para la caracterización de los aceites comestibles. Los coeficientes resaltados fueron superiores a 0.9, en algunos de los cuatro aceites.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Perfil de ácidos grasos de aceites vegetales comestibles obtenidos de diferentes fuentes.
- Figura 2.** Hidrólisis de triacilgliceroles.
- Figura 3.** Esquema de oxidación de lípidos insaturados promovida por radicales.
- Figura 4.** Estructura de divinílmetano presente en ácidos grasos poliinsaturados.
- Figura 5.** Algunas rutas de descomposición de hidroperóxidos en grasas.
- Figura 6.** Tipos de aldehídos que se pueden encontrar en los aceites como productos de su degradación oxidativa.
- Figura 7.** Descomposición de hidroperóxidos, productos de la peroxidación lipídica, y obtención de hexanal [16].
- Figura 8.** Reacción de los alcanales con el grupo sulfidrilo de la cisteína [3].
- Figura 9.** Reacción de los alcanales con proteínas.
- Figura 10.** Reacción entre MDA y TBA para la formación del cromógeno.
- Figura 11.** Reacción de derivación de los aldehídos con PFPH.
- Figura 12.** Evolución de la composición de ácidos grasos (determinados en forma de sus FAME`s), con el tiempo de calentamiento (190 ± 2 °C), en los aceites Búcaro y Andaluz.
- Figura 13.** Evolución de la composición de ácidos grasos (determinados en forma de sus FAME`s), con el tiempo de calentamiento (190 ± 2 °C), en los aceites Oleocali y Oliosoya.

- Figura 14.** Evolución de la composición de los ácidos grasos saturados e insaturados (en su forma de FAME`s), con el tiempo de calentamiento. Porcentaje de degradación, de los FAME`s totales, con respecto al aceite sin calentar.
- Figura 15.** Índice de yodo de las muestras de aceites calentados ($190 \pm 2^\circ\text{C}$).
- Figura 16.** Grado de acidez de las muestras de aceite calentado ($190 \pm 2^\circ\text{C}$).
- Figura 17.** Comparación de la cantidad de PFPH retenida sobre las tres fibras (PDMS, PDMS-DVB, PA).
- Figura 18.** Curva de saturación de la fibra de PDMS-DVB con PFPH.
- Figura 19.** Exposición de la fibra de PDMS-DVB a una solución acuosa de PFPH de 0.8 mM.
- Figura 20.** Análisis del derivado del malondialdehído. **a.** Cromatograma típico del derivado del malondialdehído (columna DB - 5MS de 50 m, MSD). **b.** Espectro de masas del único pico presente en el cromatograma. **c.** Cromatograma típico del derivado del malondialdehído (columna HP-5 de 30 m, ECD).
- Figura 21.** Esquema de fragmentación de la pentafluorofenilpirazol (PFPH-MDA).
- Figura 22.** Derivatización con PFPH de los aldehídos saturados removidos del espacio de cabeza de soluciones oleosas de concentraciones entre 0.1 y 1.0 μM (matriz oleosa, ver **Tabla 7**). Tiempo de derivación 40 min.
- Figura 23.** Derivatización con PFPH de los aldehídos saturados removidos del espacio de cabeza de soluciones oleosas de concentraciones entre 0.1 y 5.0 μM (matriz oleosa, ver **Tabla 7**). Tiempo de derivación 15 min.
- Figura 24.** Derivatización con PFPH de los aldehídos saturados volátiles removidos del espacio de cabeza de un aceite calentado durante 15 horas a $190 \pm 2^\circ\text{C}$ (matriz oleosa, ver **Tabla 7**). El tiempo de derivación varió entre 1 y 40 min.

- Figura 25.** Derivatización con PFPH de los aldehídos saturados removidos del espacio de cabeza de soluciones oleosas de concentraciones entre 3.0 y 100 μM (matriz oleosa, ver **Tabla 7**). Tiempo de derivación 1 min.
- Figura 26.** Cromatogramas de aldehídos derivados con PFPH. **a.** Aldehídos obtenidos por el método desarrollado, para un aceite calentado durante 15 horas, a 190 ± 2 $^{\circ}\text{C}$; **b.** Aldehídos insaturados (patrón); **c.** Aldehídos en aceite vegetal (Oleocali) calentado durante 24 horas, en ciclos de 6 horas diarias, a 190 ± 2 $^{\circ}\text{C}$.
- Figura 27.** Cromatogramas típicos de aldehídos, presentes en espacio de cabeza, de los aceites vegetales sin calentar (blancos).
- Figura 28.** Evolución de la concentración de aldehídos volátiles, en aceites vegetales de consumo humano, después de varios períodos de calentamiento, a 190 ± 2 $^{\circ}\text{C}$.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	15
2. MARCO TEÓRICO	18
2.1 ACEITES DE CONSUMO HUMANO.....	18
2.2 LA FRITURA PROFUNDA.....	22
2.3 DEGRADACIÓN DE ACEITES.....	23
2.4 ALDEHÍDOS: SU PRESENCIA EN LOS ORGANISMOS VIVOS.....	27
2.5 MONITOREO DE LA DEGRADACIÓN OXIDATIVA EN ACEITES	31
2.6 ANÁLISIS DE ALDEHÍDOS.....	36
2.7 MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA.....	39
3. METODOLOGÍA.....	42
3.1 SELECCIÓN DE LOS ACEITES A ESTUDIAR.....	42
3.2 TRATAMIENTO TÉRMICO DE LAS MUESTRAS DE ACEITE.....	43
3.3 ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS DE ACEITE.....	43
3.3.1 Ácidos grasos en aceites.....	43
3.3.2 Grado de acidez.....	45
3.3.3 Índice de yodo.....	46
3.3.4 Análisis de aldehídos volátiles en aceites.....	46
3.3.4.1 Selección de la fibra.....	48
3.3.4.2 Condiciones de absorción de la PFPH.....	49
3.3.4.3 Síntesis del derivado del malondialdehído.....	51
3.3.4.4 Condiciones de derivación de los aldehídos.....	52
3.3.4.5 Curva de calibración.....	53
4. RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	55
4.1 SELECCIÓN DE LOS ACEITES.....	55
4.2 TRATAMIENTO TÉRMICO DE LOS ACEITES.....	58
4.3 ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS DE ACEITE.....	58
4.3.1 Ácidos grasos en aceites.....	58
4.3.2 Índice de yodo.....	65
4.3.3 Grado de acidez.....	66

4.3.4 Determinación de aldehídos volátiles en aceites.....	68
4.3.4.1 Selección de la fibra.	68
4.3.4.2 Condiciones de absorción de la PFPH.	70
4.3.4.3 Síntesis del derivado del malondialdehído.	73
4.3.4.4 Condiciones de derivación de los aldehídos.....	76
4.3.4.5 Curva de calibración.....	81
4.3.4.6 Determinación del NMD y NMC.....	85
4.3.4.7 Determinación de los aldehídos volátiles en las muestras de aceite	86
4.4 COMPARACIÓN DE MÉTODOS.....	94
CONCLUSIONES.....	97
RECOMENDACIONES	99
ANEXOS	100
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	106

RESUMEN

TÍTULO: DETERMINACIÓN DE ALDEHÍDOS VOLÁTILES EN ACEITES COMESTIBLES, POR MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA EN EL MODO *HEADSPACE* *

AUTOR: RODRÍGUEZ R. **

PALABRAS CLAVES: Aceites comestibles, microextracción en fase sólida, peroxidación lipídica, derivatización, PFPH, aldehídos volátiles, GC/ECD.

DESCRIPCIÓN

Se desarrolló un método por micro extracción en fase sólida (SPME) en el modo *headspace*, con derivación sobre la fibra, y cromatografía de gases con detector de captura de electrones (GC/ECD), para la determinación de los aldehídos volátiles en aceites comestibles. El método se usó para hacer seguimiento del contenido de aldehídos en cuatro marcas de aceites comestibles ofrecidas en el mercado de Bucaramanga (Búcaro, Oleocali, Oliosoya y Andaluz) después calentarse durante varios periodos (0, 3, 6 y 9 horas a 190 °C). Se evaluó la posibilidad de usar el contenido de aldehídos como indicador de la extensión de la peroxidación lipídica bajo las condiciones de estudio de las muestras en este trabajo.

Los aldehídos presentes en los aceites comestibles, tienen particular importancia por las siguientes razones: participan en la inhibición del metabolismo; la influencia que tiene en el sabor y olor de alimentos y porque son susceptibles de ser usados como indicadores de la peroxidación lipídica. Tener conocimiento del contenido de aldehídos presentes en aceites comestibles es una importante posibilidad para prevenir enfermedades que puedan estar asociadas con estos.

El método desarrollado permitió identificar y cuantificar los siguientes aldehídos en aceites comestibles calentados: etanal, propanal, butanal, pentanal, hexanal y octanal. El método fue rápido (ca. 25 min por muestra), reproducible (CV < 5%), y con un nivel mínimo de cuantificación alrededor de 0.1µM. Bajo las condiciones estudiadas no fue posible usar la concentración de aldehídos como indicadores de la peroxidación lipídica.

* Trabajo de grado

** Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Elena E. Stashenko.

SUMMARY

TITLE: DETERMINATION OF VOLATILE ALDEHYDES IN EDIBLE OILS, BY MICROEXTRACTION IN SOLID PHASE IN THE WAY HEADSPACE

AUTHOR: RODRÍGUEZ R.

KEY WORDS: edible oil, solid phase micro extraction, lipid peroxidation, derivatization, PFPH, volatile aldehydes, GC/ECD

DESCRIPTION

A headspace-solid phase micro extraction (SPME) analytical method was developed for the determination of volatile aldehydes in edible oils. The method uses derivatization on the fiber, and gas chromatography with electron capture detector (GC/ECD). This method was used to monitor the content of aldehydes in four commercial trademarks of edible oils offered in Bucaramanga (Búcaro, Oleocali, Oliosoya and Andalucía), after being heated during several periods (0, 3, 6 and 9 hours to 190 °C). The possibility of using the content of aldehydes as indicator of the lipid peroxidation extension under the conditions studied was evaluated in this work.

The aldehydes present in edible oils, have a particular relevance for the following reasons: they take part in the inhibition of the metabolism; they influence the flavor and scent of foods, and they are susceptible to being used as indicators of the lipid peroxidation. Knowing the aldehydes content in edible oils is an important possibility to prevent illnesses that can be associated with them.

The method developed allowed the identification and quantification of the following aldehydes in heated edible oils: ethanal, propanal, butanal, pentanal, hexanal and octanal. The method was fast (ca. 25 min per sample), reproducible (CV <5%), and with a minimum level of quantification around 0.1µM. Under the studied conditions it was not possible to use the aldehyde concentrations as indicators of the lipid peroxidation.

* Grade work

* * Faculty of Sciences. School of Chemistry. Elena E. Stashenko.

1. INTRODUCCIÓN

Los aceites vegetales comestibles son mezclas cuyos componentes mayoritarios son los ésteres de ácidos grasos con glicerol (triacilgliceroles), que representan alrededor de un 99% de los componentes totales. El uso que se le da a cada uno de estos aceites, bien sea como aderezo, materia prima para producir mantequillas o mayonesas, o para el proceso de fritura, depende en parte de la composición de ácidos grasos, ya que éstos determinan sus propiedades físicas, químicas y organolépticas.

En los procesos de fritura profunda se prefieren aceites líquidos a temperatura ambiente, y estables a la temperatura de fritura (170 a 220 °C). A estas temperaturas, es muy frecuente que los aceites sufran reacciones que modifican sus propiedades. Las principales reacciones que presentan estos aceites son la oxidación y la hidrólisis. La reacción de hidrólisis se da en los enlaces éster de los acilglicéridos. Esta reacción influye considerablemente sobre el incremento de la acidez y la disminución del punto de humo.

Por su parte, la oxidación se da principalmente en las insaturaciones de los ácidos grasos poliinsaturados, como el ácido linoleico y linolénico. Los productos primarios de esta oxidación son los hidroperóxidos lipídicos. Posteriormente, estos hidroperóxidos pueden degradarse y producir un conjunto variado de compuestos, entre los que se encuentran, ácidos, cetonas y aldehídos volátiles.

Estas dos reacciones (hidrólisis y oxidación lipídica) modifican propiedades físicas, química y organolépticas de los aceites, que hacen, que su aceptabilidad por los consumidores se vea disminuida y, además, que se produzca un conjunto de compuestos, los cuales, potencialmente, pueden representar un riesgo para la salud humana. Esto último, es el caso de algunos aldehídos volátiles.

Estos aldehídos volátiles, entre los que se pueden encontrar saturados e insaturados, tiene gran relevancia, por el hecho de que pueden reaccionar con los grupos tiolo y amino de enzimas y proteínas, o los grupos amino de ácidos nucleicos [1]. A la anterior propiedad de los aldehídos se le asocia la toxicidad que presentan algunos de los aldehídos que se producen con la oxidación lipídica [1].

En este trabajo, se consideró que era posible desarrollar un método para determinar algunos de estos aldehídos, en específico, aldehídos saturados e insaturados como etanal, propanal, butanal, pentanal, hexanal, octanal, nonanal, decanal, malondialdehído, acroleína, crotonaldehído, *trans*-2-pentenal y *trans*-2-heptenal. Para el desarrollo del método se usó la microextracción en fase sólida (SPME), el modo *headspeace*, con derivatización directa sobre la fibra, en y, la cromatografía de gases con detector de captura de electrones (GC-ECD). El agente derivatizante utilizado fue la pentafluorofenilhidracina (PFPH). Además, se buscó, que el método no incluyera la necesidad de calentar el aceite para hacer el análisis, pues, las altas temperaturas provocan la oxidación y la hidrólisis, y por tanto afectaría la concentración de los aldehídos presentes en el aceite, desviando la precisión de la determinación.

Para el desarrollo del método planteado se contó con tres recubrimientos de fibras, a saber: [poli(acrilato), poli(dimetilsiloxano) y poli(dimetilsiloxano)/divinilbenceno]. De éstas se seleccionó para la determinación

de aldehídos a de poli(dimetilsiloxano)/divinilbenceno (PDMS-DVB), por su afinidad con el agente derivatizante utilizado, la pentafluorofenilhidracina (PFPH).

Los respectivos derivados hidrazónicos de los aldehídos se separaron, se identificaron y se cuantificaron por cromatografía de gases con detector de captura de electrones (ECD).

Una vez desarrollado el método para la determinación de aldehídos, se aplicó a cuatro aceites comestibles ofrecidos en el mercado, seleccionados con base en una encuesta, realizada entre vendedores de comidas “rápidas” que se ubican en los andenes de la ciudad. Estos aceites fueron sometidos a diferentes periodos de calentamiento (0, 3, 6 y 9 horas) a 190 ± 2 °C. Paralelamente, a los aceites se le determinó el contenido de ácidos grasos (en forma de sus metilésteres), el índice de acidez y el índice de yodo. Lo anterior se realizó para evaluar la posibilidad de usar el contenido de los aldehídos como indicadores del grado de deterioro oxidativo del aceite; lo cual se hizo, correlacionando los resultados de cada uno de las determinaciones realizadas con la de aldehídos.

Con el método desarrollado fue posible la determinación de los siguientes aldehídos en aceites: etanal, propanal, butanal, pentanal, hexanal y octanal. El nivel mínimo de detección estuvo alrededor de $0.5 \mu\text{M}$ y, el tiempo por cada muestra (con tres réplicas) fue de aproximadamente una hora. Se encontró, que todos los aceites ofrecidos en el mercado y estudiados en este trabajo contiene todos los aldehídos que permitió determinar el método.

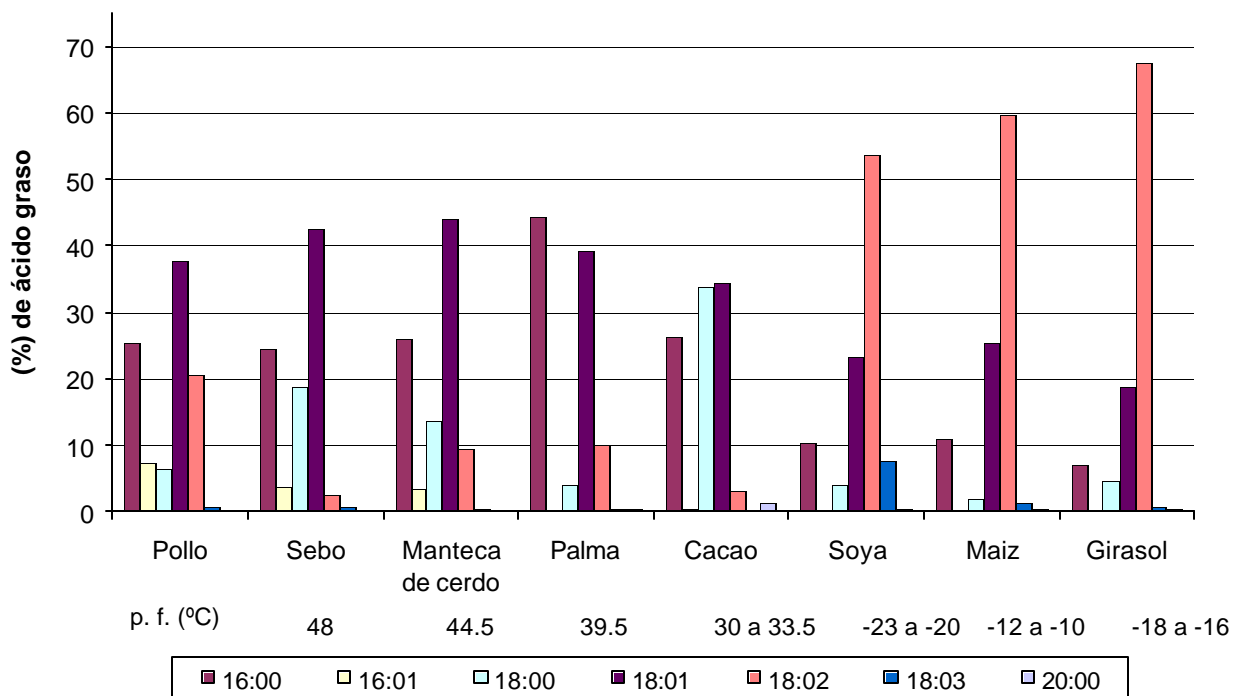
2. MARCO TEÓRICO

2.1 ACEITES DE CONSUMO HUMANO

Los aceites de consumo humano son mezclas de triacilgliceroles con pequeñas cantidades (menores del 1%) de vitaminas A y E, colesterol y algunos antioxidantes, adicionados en el proceso de obtención. Estos aceites se pueden obtener de las células del tejido adiposo de animales, o de las semillas y frutos de plantas como maíz, girasol, cacahuete, algodón, soja y palma, entre otras [10].

La composición de ácidos grasos en forma de triacilgliceroles en los aceites depende de una gran variedad de factores, a saber: la fuente de dónde proviene el aceite (ver **Figura 1**), las condiciones en qué se produce, el lugar dónde se crían los animales o calidad del suelo donde se cultivan las plantas, así como su edad, entre otros. A su vez, tanto el contenido de triacilgliceroles, como el de ácidos grasos influyen sobre las propiedades físicas, químicas y organolépticas de los aceites. En la **Figura 1**, se muestra el contenido de ácidos grasos en algunos aceites de origen animal y vegetal [1-3]. En esta Figura se puede ver, que los aceites o grasas provenientes del pollo, el ganado, la palma y del cerdo presentan mayor contenido de ácidos palmítico (C16:0) y oleico (C18:1), mientras que en los aceites de soja, maíz y girasol abundan los ácido oleico (C18:1) y linoleico (C18:2). También se muestra en la **Figura 1**, que el contenido de ácidos grasos en estos aceites está relacionado con las temperaturas de fusión de los mismos. Sobre esto último, sucede en general, que cuanto más insaturaciones haya en los ácidos grasos, menor es su punto de fusión, y tanto mayor sea la longitud de cadena de los ácidos grasos, mayor será el punto de fusión [10] (ver **Tabla 1**).

Figura 1. Perfil de ácidos grasos de aceites vegetales comestibles obtenidos de diferentes fuentes [10-12].



En cuanto a las propiedades químicas de los aceites comestibles, se tiene que aquellos con mayor concentración de ácidos grasos insaturados son más susceptibles a presentar reacciones de oxidación lipídica, las cuales les confieren olores y sabores desagradables (rancidez) [13,14]. Sin embargo, estos aceites desde el punto de vista nutricional tienen un gran valor ya que contienen ácidos como el linoleico (18:2), que es considerado *indispensable* para el organismo humano, por el hecho de que éste no lo sintetiza, y lo requiere para los procesos metabólicos. El ácido linoleico forma parte constitutiva de la membrana de diferentes tipos de células, y, a su vez, es precursor del ácido araquidónico (C20:4), que también es considerado *indispensable*. El ácido araquidónico le da

rigidez a la mitocondria de las células y es utilizado en la síntesis de las hormonas prostaglandinas [10].

Tabla 1. Ácidos grasos más comunes en aceites [1].

Símbolo	Nombre común	Temp. de fusión (° C)
<i>Ácidos grasos saturados:</i>		
C12:0	Ácido láurico	42
C14:0	Ácido mirístico	52
C16:0	Ácido palmítico	63
C18:0	Ácido esteárico	69.6
C20:0	Ácido araquídico	75.4
<i>Ácidos grasos insaturados:</i>		
C16:1	Ácido palmitoleico	-0.5
C18:1	Ácido oleico	13.4
C18:2	Ácido linoleico	-9
C18:3	Ácido linolénico	-17

Una vez consumidos los aceites, sus componentes principales se hidrolizan, convirtiéndose a glicerol y el ácido graso correspondiente. Este proceso se lleva a cabo en el intestino delgado, por acción de las lipasas secretadas en el páncreas. La hidrólisis (o digestión) de los triacilgliceroles toma lugar en la interfase “lípidos-agua” debido a que el aceite es insoluble en agua, mientras que las enzimas son solubles en agua. Esta reacción es acelerada por la acción emulsificante de los ácidos biliares. Luego, ocurre la absorción de los ácidos grasos por la capa de células de la pared del intestino delgado, la cual se ve favorecida por el hecho de que los ácidos forman emulsiones.

En el interior de las células, los ácidos grasos forman complejos con la proteína citoplasmática enlazante de ácidos grasos intestinales (I-FABP), que aumenta la solubilidad efectiva de las sustancias insolubles en agua y evita la acción detergente de las sales de ácidos grasos sobre las células. Posteriormente, estos ácidos grasos son convertidos nuevamente a triacilgliceroles y empaquetados en lipoproteínas (llamadas quilomicrones), las cuales son conducidas a través del sistema linfático hasta el torrente sanguíneo donde son liberadas para ser conducidas a los tejidos. En los capilares del tejido adiposo y de los músculos esqueléticos, los triacilgliceroles son nuevamente hidrolizados, esta vez por la enzima lipasa lipoproteína, y los ácidos entran a formar parte del tejido mientras que el glicerol es transportado al hígado o al riñón [1].

Los triacilgliceroles son la principal reserva de energía en los mamíferos. Comparado con los carbohidratos y las enzimas en peso seco, los triacilgliceroles almacenan dos veces más energía (ver **Tabla 2**). Como los triacilgliceroles almacenan la energía en forma anhidra (a diferencia de los carbohidratos), su capacidad de almacenamiento es seis veces mayor que la de los carbohidratos [1]. Otra función importante que cumplen los triacilgliceroles es la de proteger a los organismos vivos de los cambios bruscos en el ambiente, porque actúan como aislantes térmicos eficientes. Por lo anterior, y por el hecho de que en el cuerpo humano el contenido de grasa aproximadamente corresponde a un 21% en hombres y un 26% en las mujeres, así como, por el importante papel que cumplen en la estructura celular y en el metabolismo de los organismos, se hace importante evaluar la calidad de los aceites que consumen los seres humanos. La calidad evaluada en cuanto a su composición en triacilgliceroles y otros compuestos (como aldehídos, ácidos grasos, etc.) que pueden estar presentes como producto de su degradación y que pueden tener efectos nocivos sobre la salud humana.

Tabla 2. Contenido energético de constituyentes de alimentos [1].

Compuesto	kJ/g (en peso seco)
Carbohidratos	16
Grasas	37
Proteínas	17

2.2 LA FRITURA PROFUNDA

Los aceites se consumen de diferentes maneras, bien sea como aderezos, en forma de emulsiones como en la mayonesa, o en alimentos, que han sido fritos previamente. Ésta última forma se hace sumergiendo los alimentos durante un período determinado de tiempo en un aceite caliente, entre 170 y 220⁰C, y se le denomina fritura profunda.

A temperaturas como las que se emplean en la fritura profunda, los aceites sufren reacciones de deterioro (hidrólisis, oxidación y polimerización), que hacen que la calidad del aceite disminuya. Bajo estas condiciones, el aceite pierde su color característico, y produce, por descomposición de los triacilgliceroles, gran cantidad de compuestos volátiles y algunos tóxicos, con olores desagradables, e.g. algunos aldehídos [2,3,14]; además se forman polímeros que se acumulan en las orillas de los recipientes de fritura [15].

Para el uso de aceites en el proceso de fritura se procura utilizar aquellos que son estables a temperaturas altas, de tal manera, que puedan ser reutilizados. Una mayor estabilidad (a las diferentes reacciones de deterioro) se puede conseguir

con aceites con alto contenido de ácidos grasos saturados, tales como el aceite de palma, la manteca de cerdo o el sebo (ver **Figura 1**). Sin embargo, estos aceites por ser sólidos a temperatura ambiente, hacen que sus propiedades organolépticas no sean las apetecidas por el consumidor, puesto que queda una sensación grasosa en el paladar. Por otro lado, los aceites con alto contenido de ácidos grasos insaturados como el de soja, maíz o girasol, que sí son líquidos a temperatura ambiente, no tienen la misma estabilidad (a las diferentes reacciones de deterioro) que los aceites con alto contenido de ácidos grasos saturados, a las temperaturas de fritura.

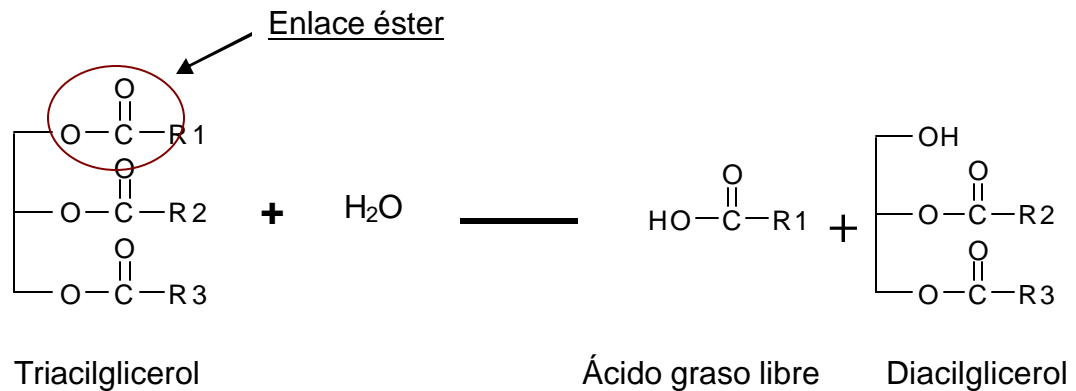
Para los procesos de fritura se busca equilibrar la estabilidad térmica del aceite y el estado físico; lo que ofrece un aceite aceptable, tanto en cuanto a la estabilidad en el proceso de fritura, como en sus propiedades organolépticas. Una forma de lograrlo es haciendo mezclas en diferentes proporciones de aceites saturados e insaturados. Algunas de estas mezclas se encuentran en el mercado local en presentaciones de diferentes marcas. Para el presente trabajo, se escogieron aceites de cuatro marcas, teniéndose en cuenta aquellas que se usan en la fritura, en puestos de comida callejera, ya que en los últimos años se ha incrementado el consumo de alimentos preparados con aceites a temperaturas de fritura (comidas rápidas).

2.3 DEGRADACIÓN DE ACEITES

Los aceites y, en general, los lípidos, se degradan principalmente a través de dos reacciones, *i.e.* la hidrólisis y la oxidación lipídica. La hidrólisis en los aceites se presenta en el enlace éster de los triacilglicerol y es catalizada por enzimas (lipasas) o en presencia de agua a temperaturas altas. Dependiendo del grado de hidrólisis, se pueden producir uno, dos o tres ácidos grasos libres y diacilglicerol, monoglicérido y glicerol, respectivamente (ver **Figura 2**). Estos ácidos grasos

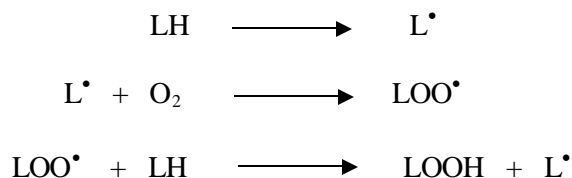
libres, cuando se encuentran en los aceites por encima del 1%, pueden disminuir el punto de humo y, a la vez, aumentar la susceptibilidad de los aceites a la oxidación.

Figura 2. Hidrólisis de triacilgliceroles.



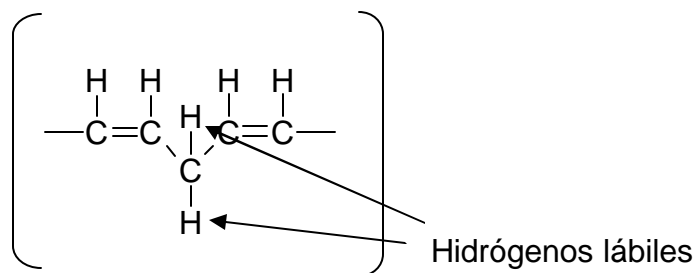
Por otra parte, la reacción que más deterioro produce en los aceites es la oxidación lipídica; ésta ocurre principalmente sobre los ácidos grasos poliinsaturados, linoleico y linolénico, cuando en el medio hay presencia de “iniciadores” (especies capaces de aceptar un hidrógeno) [16], y puede ser catalizada por lipoxigenasas, metales [17], la irradiación, la luz [18] o por las temperaturas altas, como las que se presentan durante los procesos de fritura [19-21]. La oxidación inicia con la formación de un radical alquílico en un ácido graso insaturado (L^\bullet) y un radical peroxilo (LOO^\bullet), y se propaga en presencia de oxígeno a través de un mecanismo de radicales, hasta formar los hidroperóxidos (LOOH) (ver **Figura 3.**) [16]. El hecho, que la oxidación ocurre básicamente sobre los ácidos grasos poliinsaturados, se debe a que éstos poseen hidrógenos lábiles como los enlazados al carbono metilénico de la estructura divinil-metano (ver **Figura 4**) [22].

Figura 3. Esquema de oxidación de lípidos insaturados promovida por radicales [23].



Los hidroperóxidos (LOOH), que se obtienen como productos iniciales de la oxidación, y que también podrían encontrarse en los aceites como residuos de su proceso de formación, participan en reacciones posteriores, que pueden producir una gran variedad de productos (ver **Figura 5**), entre los cuales se encuentran monómeros, polímeros, aldehídos, diperoxidos, epóxidos y ácidos, entre otros [16,23,24].

Figura 4. Estructura de divinímetano presente en ácidos grasos poliinsaturados.

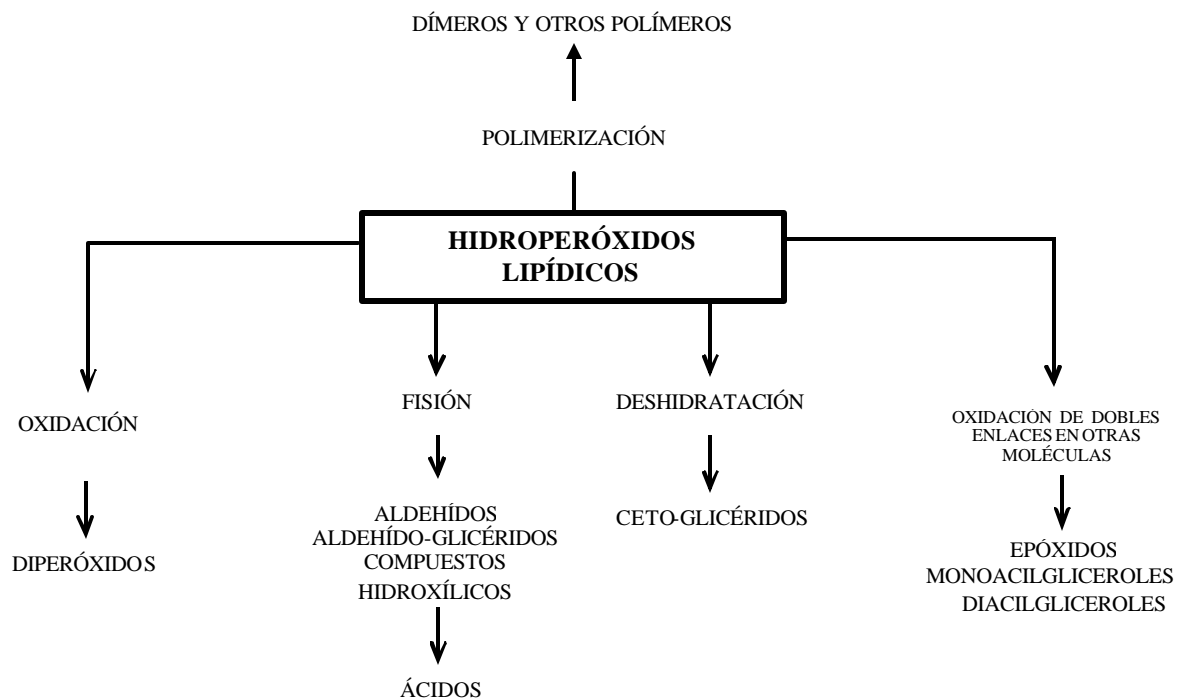


Estructura de divinímetano

De estos productos de la descomposición de hidroperóxidos se destacan los compuestos carbonílicos volátiles (aldehídos y cetonas), por su impacto sobre el

sabor y olor de los aceites [14], así como por su toxicidad [2,3]. Entre estos compuestos carbonílicos ha sido identificada una gran variedad de aldehídos, generados por la descomposición de diferentes fuentes, bien sea hidroperóxidos, ácidos grasos o de triacilgliceroles (ver **Tabla 3**) [24].

Figura 5. Algunas rutas de descomposición de hidroperóxidos de grasas [25].



En general, las reacciones de deterioro de los triacilgliceroles hacen que las propiedades físicas (viscosidad, color, índice de refracción, punto de fusión) y químicas (contenido de ácidos indispensables y de otros compuestos) de los aceites se modifiquen, afectando sus propiedades organolépticas y disminuyendo su valor nutricional. Además, algunos de los productos de este deterioro podrían reaccionar con los grupos amino y tiol de proteínas o grupos amino de bases nitrogenadas, cuya consecuencia sería indeseable para los consumidores. Esto último es el caso de los aldehídos [2,3].

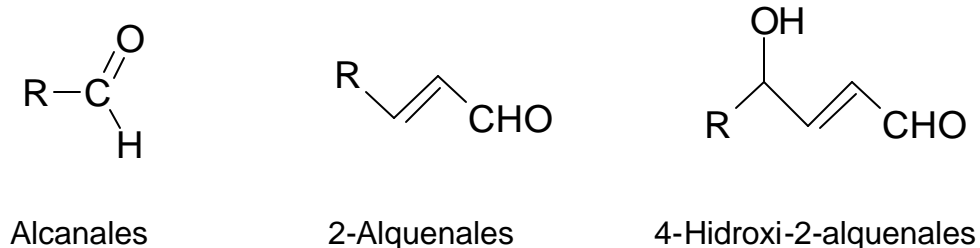
Tabla 3. Algunos compuestos carbonílicos volátiles, productos de la oxidación térmica de linoleato y linolenato [24]. Los aldehídos subrayados son objeto de seguimiento en este estudio.

Productos volátiles de la oxidación térmica de linoleato y sus hidroperóxidos		Productos volátiles de la oxidación térmica de linolenato y sus hidroperóxidos	
Compuestos volátiles:	Fuente:	Compuestos volátiles:	Fuente:
3-Nonenal		3,6-Nonadienal	
2,4-Decadienal	9-OOH	2,4,7-Decatrienal	9-OOH
<u>Hexanal</u>	9-OOH	3-Hexenal	9-OOH
<u>Etanal</u>	13-OOH	2,4-Heptadienal	12-OOH
<u>Acroleína</u>	Me-OOH	3-Hexenal	12-OOH
<u>Propanal</u>	Trilinoleína	<u>Acroleína</u>	13-OOH
<u>Butanal</u>	Trilinoleína	<u>Etanal</u>	16-OOH
<u>Pentanal</u>	Trilinoleína	<u>Butanal</u>	Me-OOH
<u>Heptanal</u>	Trilinoleína	<u>2-Butenal</u>	Me-OOH
<u>Nonanal</u>	Trilinoleína	<u>2-Pentenal</u>	Trilinolenina
<u>2-Heptenal</u>	Etil-Linoleato	2-Nonenal	Me-Éster
<u>2-Octenal</u>	Trilinoleína	Me 8-Oxooctanoato	Me-Éster
2-4-Nonadienal	Etil-linoleato	Me 9-Oxononanoato	Me-OOH
		<u>Malondialdehído</u>	Me-OOH

2.4 ALDEHÍDOS: SU PRESENCIA EN LOS ORGANISMOS VIVOS

Los aldehídos son compuestos que en su estructura molecular contienen un carbono carbonílico con dos sustituyentes, uno de los cuales es hidrógeno y el otro un grupo alquílico. Este último puede ser saturado, insaturado y/o contener grupos hidroxílicos. En los productos de la degradación oxidativa de aceites se pueden encontrar los alcanales, alquenes ó 4-hidroalquenes, entre otros (ver **Figura 6**)

Figura 6. Tipos de aldehídos que se pueden encontrar en los aceites como productos de su degradación oxidativa.



R: puede ser una cadena carbonada saturada o hidrógeno.

Los aldehídos son compuestos polares con puntos de ebullición superiores a los compuestos no polares del mismo peso molecular, pero más bajos que los alcoholes y ácidos, debido a la posibilidad de los últimos de formar puentes de hidrógeno. Los aldehídos son solubles en solventes orgánicos usuales. En agua son solubles aquellos con átomos de carbono < 5, entre 5 y 11 átomos de carbono son ligeramente solubles y los de cadenas más largas se consideran insolubles en agua.

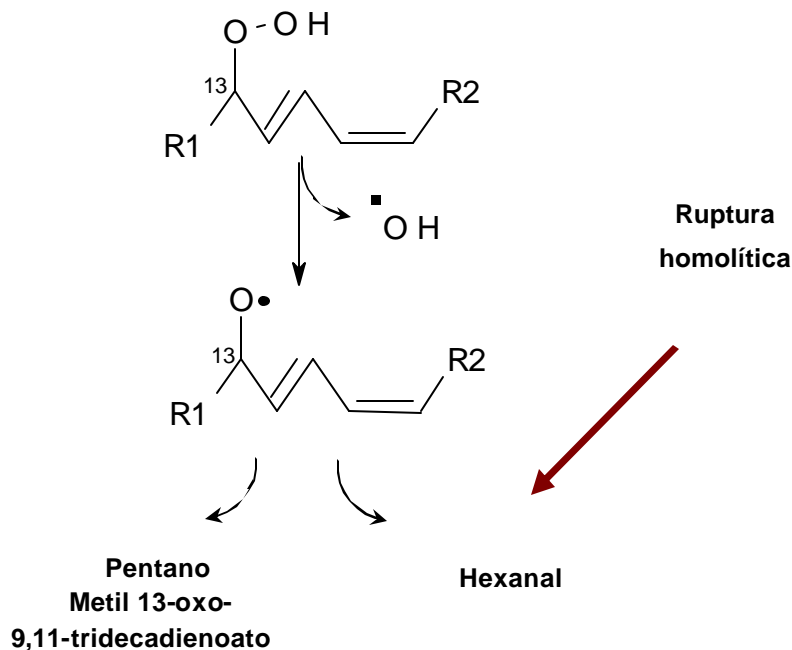
Las propiedades químicas de los aldehídos se determinan en gran medida por la presencia del grupo carbonílico, debido a la capacidad del oxígeno de soportar una carga negativa. Esto hace que el carbono carbonílico sea electrodeficiente y proporcione un sitio activo para la adición nucleofílica. Además, esta propiedad del oxígeno carbonílico aumenta la acidez de los átomos de hidrógeno unidos al carbono α [26].

Entre las reacciones que pueden sufrir los aldehídos, se encuentran su oxidación a ácidos; la reducción a alcoholes, hidrocarburos, o a aminas primarias y secundarias, cuando la reducción se lleva a cabo en presencia de amoníaco o

aminas primarias, respectivamente. También suelen presentar reacciones de adición de cianuro, reactivo de Grignar, carbaniones y derivación con amoníaco.

En los aceites, los aldehídos se producen a través de la escisión de los hidroperóxidos lipídicos formados en la primera etapa de la oxidación lipídica (ver **Figura 7**). Los principales hidroperóxidos y acilglicéridos que conducen, por su degradación, a la formación de los aldehídos que frecuentemente se encuentran en los aceites se presentan en la tabla **Tabla 3**. En los aceites, estos aldehídos producidos, contribuyen significativamente a su sabor y olor característico, así como a aquellos olores que dan la percepción de deterioro del aceite.

Figura 7. Descomposición de hidroperóxidos, productos de la peroxidación lipídica, y obtención de hexanal [16].



En humanos y animales, los aldehídos se pueden encontrar en la sangre, las células y en los tejidos, como intermediarios del metabolismo. Además, se

encuentran en las plantas, los frutos y en microorganismos. Éstos se pueden producir por irradiación de los carbohidratos y enzimas con fotones de alta energía y por oxidación de ácidos grasos y grasas insaturadas. Su efecto en los organismos vivos comprende la inhibición del metabolismo energético, la biosíntesis de ácidos nucleicos y proteínas y la mitosis [3]. Así mismo, algunos aldehídos, en especial, los 4-hidroxi alquenes y 2-alquenes, poseen las actividades citotóxica, mutagénica y carcinogénica [2,3,9].

El efecto de los aldehídos sobre los organismos vivos se debe principalmente a las reacciones que puede tener el grupo carbonílico de los aldehídos con el grupo sulfidrilo de proteínas, por un lado, y el grupo amino de aminoácidos, proteínas y ácidos nucleicos, por otro [3]. Por ejemplo, los alcanales pueden reaccionar con la cisteína para formar un ácido tiazolidinecarboxílico (ver **Figura 8**). Con los grupos amino, pueden formar bases de Schiff y con las proteínas se pueden entrelazar así como se muestra en la **Figura 9**. Los 2-alquenes, por su parte, reaccionan con los grupos sulfidrilo a través de una adición al grupo olefínico α,β , exclusivamente, y con los grupos amino para formar bases de Schiff [3].

Figura 8. Reacción de los alcanales con el grupo sulfidrilo de la cisteína [3].

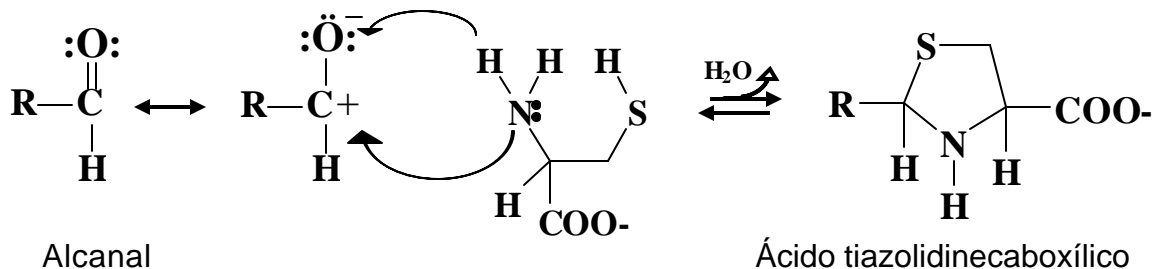
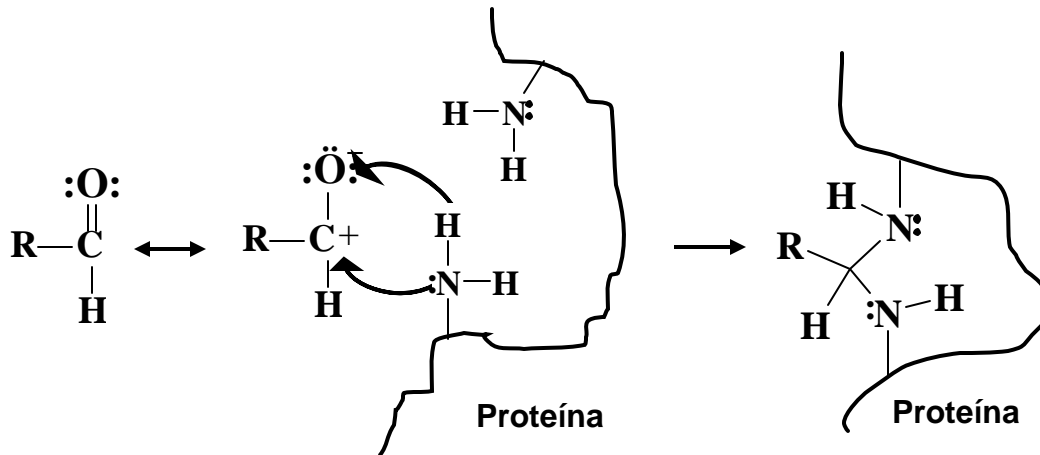


Figura 9. Reacción de los alcanos con proteínas [3].



2.5 MONITOREO DE LA DEGRADACIÓN OXIDATIVA EN ACEITES

Generalmente, en los establecimientos de ventas de comidas fritas, las personas encargadas de decidir cuándo un aceite debe sustituirse, tienen en cuenta aspectos del aceite, tales como: el color, el olor, el sabor, la formación de humo o la cantidad de espuma en la superficie del aceite. Obviamente, que si la calidad del aceite es evaluada de esta manera, su diagnóstico será muy subjetivo, por cuanto la evaluación depende de las percepciones de la persona encargada de esta decisión. Otra forma de evaluar la degradación (oxidativa o hidrolítica) se basada en el empleo de los métodos analíticos; pero pocos establecimientos lo hacen, debido a que se requiere una infraestructura relativamente costosa. Sin embargo, una ventaja de los métodos analíticos, es el hecho que miden directamente uno o varios componentes, producidos o consumidos durante la degradación lipídica, lo que los hace más objetivos.

Los métodos analíticos para la evaluación de degradación (tanto oxidativa como hidrolítica) de los aceites pueden ser clasificados en dos grupos: los que

monitorean familias de compuestos que tienen en común un grupo funcional y/o una propiedad física, y aquellos, que identifican y cuantifican compuestos que puedan ser indicativos del grado de deterioro del aceite. Entre los primeros se tiene el valor de peróxido (PV), la determinación de oxirano, el método de los dienos conjugados, determinación de los ácidos grasos libres e índice de yodo. A continuación, se discuten características de cada uno de estos métodos, pero antes es importante anotar, que no existe un solo método que ofrezca suficiente información sobre la degradación (oxidativa o hidrolítica) de los aceites. Por lo general, las informaciones que ofrecen los diferentes métodos se complementan entre sí.

El valor de peróxido (PV) cuantifica los compuestos que contengan grupos hidroperóxido. Éste se basa en la medición del yodo producido en la reacción entre yoduro de potasio y los peróxidos presentes en el aceite. Las fuentes de error de este método pueden ser: el consumo de yodo por las insaturaciones de los ácidos grasos y la liberación de yodo por la reacción del yoduro de potasio con el oxígeno presente en la solución de titulación [25].

Por su parte, la determinación de oxirano cuantifica compuestos que tienen en su estructura grupos α -epoxi, formados durante la oxidación de los lípidos insaturados. Estos grupos son determinados por la reacción con halógenos que indican el contenido de grupos α -epoxi. El método volumétrico estandarizado usa HBr para la determinación de oxirano [27].

El método de los dienos conjugados aprovecha el hecho que durante la oxidación lipídica se forman dienos y trienos conjugados que absorben en la región ultravioleta ($\lambda = 234$ nm, los dienos; y $\lambda = 268$ nm, los trienos). El inconveniente de este método radica en la poca variación de la absorción con la cantidad de insaturaciones conjugadas, que hace que no se pueda registrar pequeños

cambios en los aceites; pero, a pesar de ésto, el método se usa para medir la extensión de la degradación oxidativa [25].

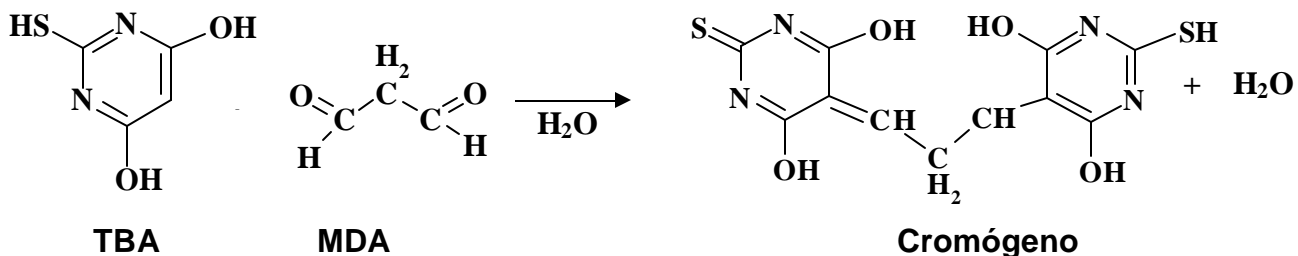
Durante la degradación de los aceites se producen ácidos grasos libres, por la hidrólisis de los glicéridos. Su cuantificación se hace por medio de la neutralización con una base. La legislación Colombiana establece un límite superior de acidez en 0,5% en ácido oleico [28]; y, por su parte, la Unión Europea este mismo índice lo fijó en 0.8% [29]. Para aceites usados en la fritura se permite hasta un índice de acidez de 2.5% en ácido oleico [30]. El inconveniente de este método es que no mide el grado de oxidación del aceite.

Un método muy utilizado en análisis de rutina de aceites es la medición del índice de yodo. Éste mide el número de insaturaciones presente en los aceites, y debido a que, durante la oxidación de los aceites, el número insaturaciones disminuye. Este índice de yodo se puede utilizar como criterio para determinar la extensión de la oxidación. El método es relativamente económico.

Por otra parte, existen los procedimientos que identifican y cuantifican compuestos, que puedan ser marcadores del grado de deterioro del aceite. Uno de estos métodos es la prueba del ácido tiobarbitúrico (TBA); la determinación de compuestos carbonílicos volátiles, productos finales de la lipoxidación, y el % de ácidos grasos modificados; análisis que se llevan a cabo por cromatografía de gases.

La prueba del ácido tiobarbitúrico se usa para medir el malondialdehído (MDA), producido a partir de los hidroperóxidos de ácidos grasos poliinsaturados (con 3 y más insaturaciones) [16]. Se basa en la formación de un cromógeno, de color rojo, por condensación entre una molécula de malondialdehído y dos moléculas de ácido tiobarbitúrico (ver **Figura 10**), que absorbe a $\lambda = 532 \text{ nm}$ [25].

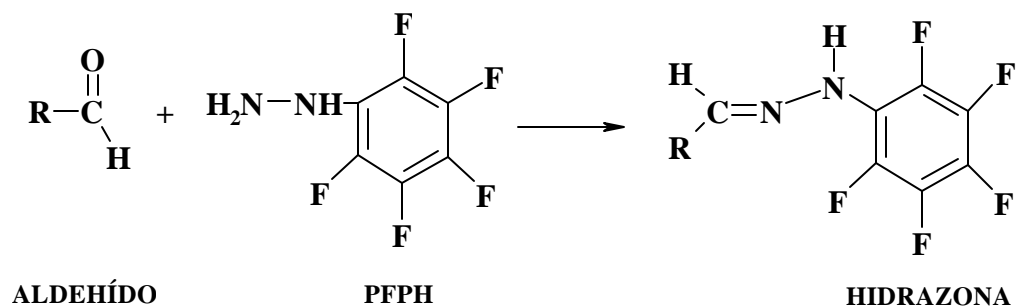
Figura 10. Reacción entre MDA y TBA para la formación del cromógeno [25].



Algunos inconvenientes de esta prueba son: la reproducibilidad baja y las reacciones colaterales, que puede sufrir el TBA con los 2,4-alcadienales y los 2-alcuénales, cuyos productos forman pigmentos rojos que absorben a 532 nm y que interfieren en el análisis [31]. A pesar de esto, la prueba de TBA es muy utilizada para determinar la oxidación lipídica de aceites.

El malondialdehído junto con otros aldehídos volátiles producidos en la oxidación lipídica, puede ser analizado por cromatografía de gases con detector de captura de electrones (ECD). Para esto, se requiere previa derivación de los aldehídos con pentafluorofenilhidracina (PFPH) (ver **Figura 11**) [32]. Con el uso de este agente derivatizante se identificaron y cuantificaron 18 compuestos carbonílicos volátiles en muestras de aceites [32]. La PFPH como agente derivatizante permitió una buena sensibilidad y reproducibilidad (%CV por debajo del 10 %) para el método. Lo anterior indica que, el uso de la PFPH, es una buena alternativa para el monitoreo de la oxidación de los lípidos en los aceites.

Figura 11. Reacción de derivación de los aldehídos con PFPH.



R: Cadena alquílica

La degradación oxidativa de los aceites también puede ser monitoreada siguiendo la concentración de los ácidos grasos presentes en el aceite antes y después someter el aceite a las condiciones de deterioro. Los ácidos grasos que generalmente se oxidan en los aceites son los ácidos grasos poliinsaturados (como los ácidos linoleico y linolénico), por cuanto, la variación en su concentración es un estimativo del grado de deterioro del aceite. Los ácidos grasos se pueden analizar por cromatografía de gases con detector de ionización en llama (FID), con previa derivación con alcoholes primarios. La norma ISO 5509 usa trifluoruro de boro en metanol como agente derivatizante para obtener los respectivos metilésteres de los ácidos grasos [33]. De los inconvenientes de este método se pueden resaltar dos, a saber: primero, que no discrimina entre ácidos grasos libres y ácidos grasos esterificados con glicerol; y segundo, su baja sensibilidad, pues, es difícil observar pequeños cambios y generalmente solo se utiliza para grasas bastantes degradadas.

2.6 ANÁLISIS DE ALDEHÍDOS

En aceites, como productos de la peroxidación lipídica se puede encontrar una gran variedad de aldehídos, tanto saturados, como insaturados (ver **Tabla 3**). Para su determinación se han desarrollado métodos cromatográficos, bien sea, en forma directa [4,5,6] o con previa derivación antes de la separación y detección [7,32,34].

Entre los métodos desarrollados que determinan el contenido de aldehídos en forma directa en aceites, se encuentra uno que combina la SPME en el modo *headspeace* y la GC/MS [6]. Con una temperatura de análisis fue de 20 °C y, un tiempo de muestreo de 30 min, este método alcanzó un límite de detección de 1 µg. Los investigadores que desarrollaron este método, no tuvieron en cuenta la posibilidad de degradación de los aldehídos a la temperatura presente en el puerto de inyección (270 °C). Además, los volúmenes de muestra fueron relativamente grandes (10 mL), y la selectividad fue pobre. Resultados semejantes obtuvieron otros autores [5,35] con sus respectivos métodos, para analizar aldehídos en forma directa. Se agrega, que en un trabajo en el que se reportó la determinación de hexanal en forma directa por HS/SPME (sobre una carne de pollo), se obtuvo coeficientes de error por encima del 10 %. Lo anterior se puede explicar por la alta volatilidad (del hexanal y otros aldehídos) y la degradación térmica en el puerto de inyección; dificultades que son implícitas a estos tipos de métodos.

La alternativa a estas dificultades (bajas selectividad, precisión y estabilidad térmica) es la derivación química, ya que ésta disminuye la volatilidad de los analitos de interés, aumenta la estabilidad térmica y química, deriva solo un grupo de compuestos, y además pueden ser usados detectores selectivos [7,32]. Algunos agentes derivatizantes usados con sus detectores requeridos son: 3-

aminofluoreteno (detector de quimioluminiscencia), cistenamina (detector de nitrógeno fósforo), 2-hidracinabenzotiazol (detector de nitrógeno fósforo), O-(2,3,4,5,6-pentafluorobencil) hidroxilamina (detector de captura de electrones) y pentafluorofenilhidracina (detector de captura de electrones), entre otros. Sin embargo, el uso de la derivación química para el análisis de aldehídos ha presentado ciertos inconvenientes, como por ejemplo, el hecho de requerir montajes engorrosos, usar cantidades de muestras y volúmenes de solventes considerables, altas temperaturas para hacer el muestreo y tiempos de análisis prolongados [7].

Un método desarrollado para la determinación de aldehídos en muestras de aceite, que usa la cistenamina como agente de derivatización, ha sido reportado [7]. Éste consistió en desalojar los volátiles del espacio de cabeza de una muestra de aceite (100 g) colocada a 200 °C, y recogerlos en una solución acuosa con cistenamina. Luego de extraer los aldehídos derivados de la solución acuosa, con diclorometano y, se le retiró la humedad de la solución; para posteriormente ser determinados los aldehídos. Aunque el método fue selectivo para aldehídos saturados y los registró hasta en el orden de ppb, éste presentó los inconvenientes que se mencionaron en el párrafo anterior.

Otro agente derivatizante que ha sido utilizado en la determinación de aldehídos es la PFPH [32]. Con este agente derivatizante se desarrollo un método en el que se requieren sólo 2 mL de muestra de aceite y, se lleva a cabo a temperatura ambiente. El método incluyó los siguientes pasos: derivación con PFPH en solución acuosa (tiempo de derivación, 3 horas), extracción de los derivados con hexano, luego las extracciones en fase sólida, deshidratación y concentración, antes de la separación y la detección con el ECD. Se reconoce, que el método tiene ventajas en cuanto al volumen de la muestra y la temperatura de muestreo, pero éste incluye muchos pasos (alargando el tiempo de análisis), además del uso de solventes.

En los últimos años ha aumentado el uso de una nueva técnica para el análisis de compuestos volátiles, ésta es, la microextracción en fase sólida (SPME). Esta técnica, usada en el modo *headspace*, permite analizar, con y/o sin derivación, los componentes volátiles de una muestra, extrayendo y concentrando simultáneamente los analitos de interés, para luego ser separados y detectados por cromatografía gases con detectores apropiados [36]. Además, tiene la ventaja de no requerir solventes, ni muchos reactivos consumibles; en fin, es una técnica rápida para el análisis de volátiles.

Con el uso de esta nueva técnica, desarrolló un método para la determinación de aldehídos saturados e insaturados (HS-SPME/GC-ECD) con derivación directa sobre la fibra [34]. El agente derivatizante que usaron, fue la pentafluorofenilhidracina. El método consistió en exponer la fibra saturada con PFPH al espacio de cabeza de la matriz, para extraer los aldehídos y derivarlos sobre la fibra y, luego, desorberlos en el puerto de inyección para su análisis. El tiempo del análisis, incluyendo saturación de la fibra, derivación y extracción de los aldehídos, fue de aproximadamente 70 minutos. La derivación permitió una alta sensibilidad del detector de captura de electrones (10-90 fmol), buena selectividad y un coeficiente de variación aceptable ($CV < 10\%$). Sin embargo, este método no fue usado para cuantificar aldehídos directamente en matrices oleosas, aunque sí se usó para registrar la presencia de éstos en aceites, pero tomando la muestra a una temperatura de 170 °C.

En el presente trabajo, se usó la técnica de SPME con derivación sobre la fibra en el modo *Headspace*, para identificar y cuantificar los aldehídos presentes en aceites; la separación y la detección se hizo por cromatografía de gases con detector de captura de electrones. Los análisis se hicieron a temperatura ambiente para evitar inducir la peroxidación, así como puede ocurrir a altas

temperaturas. El método se aplicó a aceites, que se consumen frecuentemente en nuestra ciudad, a los cuales se le indujo térmicamente la peroxidación lipídica.

2.7 MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

SPME es una nueva técnica de extracción, que se introdujo desde inicios de la década del noventa. Ésta utiliza una delgada fibra de sílice recubierta con una película fina de un polímero y, a su vez, él se soporta sobre un dispositivo que permite su manipulación. La película polimérica puede ser de diferentes materiales, por ejemplo, poli(acrilato) (PA), poli(dimetilsiloxano) (PDMS) o poli(dimetilsiloxano)/divinílbenceno (PDMS-DVB), entre otras. Cada una estas fibras tiene afinidad con diferentes grupos de compuestos, dependiendo principalmente de su polaridad y estructura.

La SPME es una técnica que ha sido muy empleada en la determinación de compuestos volátiles y semivolátiles en diferentes matrices [4,37]. Puede ser usada para el análisis de analitos en fase gaseosa o condensada y, en esta última, en el modo de inmersión directa o en el espacio de cabeza (*headspace*). La técnica ofrece ventajas importantes con respecto a las técnicas convencionales, como son: sensibilidad, selectividad, rapidez, sencillez, el no uso de solventes y pocos o ningún reactivo consumible.

La cuantificación por SPME se fundamenta en algunas expresiones matemáticas, donde se relaciona directamente la cantidad de analito extraído por la fibra y la concentración presente inicialmente en la matriz [6,38-40]. Para el análisis en fase condensada se plantea la siguiente expresión [36]:

$$n = \frac{K_{fs} V_f V_s C_o}{K_{fs} V_f + V_s}$$

Donde:

V_s = Volumen de la fase condensada;

V_f = Volumen de la fibra;

K_{fs} = Constante de equilibrio entre la fase condensada y la fibra;

n = Cantidad de analito extraído en la fibra;

C_o = Concentración inicial de analito en la fase condensada.

Si el análisis se hace en el modo *headspace*, la expresión se convierte en:

$$n = \frac{K_{fh} K_{hs} V_f V_s}{K_{fh} K_{hs} V_f + K_{hs} V_h + V_s} C_o \quad (2)$$

Donde:

K_{hs} = Constante de equilibrio entre la fase condensada y la fase gaseosa;

K_{fh} = Constante de equilibrio entre la fase gaseosa y la fibra.

Estas dos expresiones (1, 2) se aplican cuando el equilibrio entre las diferentes fases ya ha sido alcanzado y, por tanto, se hace independiente del tiempo[36].

En ocasiones, los análisis pueden resultar muy demorados (de 30 min a horas) [46], debido a que el tiempo requerido para alcanzar el equilibrio es largo. Para evitar tener que esperar tanto tiempo, se opta por realizar los análisis en condiciones de no equilibrio, si la sensibilidad del método no preocupa demasiado. Sobre estas nuevas condiciones, las preguntas que se plantean son con respecto a: la posibilidad de cuantificar y, a linealidad entre la concentración de los analitos en la fase de interés y la cantidad de los analitos en la fibra.

Se han desarrollado expresiones, para SPME en el modo de inmersión directa y en el modo *headspace* [38,39], haciendo las siguientes suposiciones: en

condiciones de no equilibrio, la difusión de los analitos desde la fase condensada hacia la fibra es la que determina el tiempo en alcanzar el equilibrio; y en no equilibrio sucede la transferencia de masa en estado estable, cuando la agitación es efectiva. Las expresiones encontradas plantean una relación lineal y entre el número de moles extraídos por la fibra y la concentración inicial en la fase condensada; y fueron comparadas con experimentos, dando una correlación aceptable [36].

Para la cuantificación por SPME con derivación sobre la fibra en condiciones de equilibrio entre las fases y reacciones implicadas, no se han desarrollado expresiones matemáticas, que la fundamenten. Lo mismo sucede para la cuantificación por SPME con derivación en condiciones de no equilibrio. Sin embargo, esto no ha sido un impedimento para cuantificar en tales condiciones [49]; pues, se construye una curva de calibración, que correlacione la respuesta del detector a la cantidad de analito extraída *versus* la concentración inicial, en unas soluciones preparadas que contengan el analito de interés y, luego, se analizan las muestras a las mismas condiciones.

El hecho que la SPME permita hacer análisis en condiciones de no equilibrio, hace que esta técnica sea versátil y pueda adaptarse a necesidades variadas.

3. METODOLOGÍA

El desarrollo del siguiente trabajo de determinación de aldehídos en aceites comestibles por microextracción en fase sólida en el modo *headspace*, así como la posible utilización de los aldehídos analizados como indicadores del deterioro de los aceites, se llevó a cabo en las siguientes etapas:

- Selección de los aceites a estudiar;
- Tratamiento térmico de las muestras de aceite a estudiar;
- Análisis de las muestras de aceite. Esta etapa, por su parte, consistió en determinación de los siguientes analitos: aldehídos volátiles, ácidos grasos, así como el grado de acidez e índice de yodo.

3.1 SELECCIÓN DE LOS ACEITES A ESTUDIAR

Se seleccionaron cuatro de los aceites vegetales más usados en la fritura de alimentos en Bucaramanga. Esta selección se basó en una encuesta, que se hizo entre vendedores de comidas “rápidas”, que se ubican en las horas nocturnas en los andenes de nuestra ciudad. Los sectores escogidos fueron: los alrededores de nuestra Universidad, el retorno del estadio, la avenida González Valencia y alrededores de la cancha del barrio Girardot. La encuesta consistió en una pregunta referente al tipo de aceite que se usa en la fritura de alimentos y a las razones, que motivan al vendedor de hacerlo (ver **Anexo 1**).

3.2 TRATAMIENTO TÉRMICO DE LAS MUESTRAS DE ACEITE

De cada uno de los aceites seleccionados, se tomaron 4 muestras de 80 mL y se calentaron a 190 ± 3 °C, durante 0, 3, 6 y 9 horas, respectivamente. Las muestras se calentaron en vasos de precipitados de 100 mL, quedando la superficie del aceite expuesta al aire atmosférico. Al final del período de calentamiento, las muestras se sellaron y se almacenaron en frascos ámbar a una temperatura de 4 °C.

3.3 ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS DE ACEITE

A las muestras de aceite, tratadas térmicamente, se les realizaron las siguientes determinaciones: aldehídos volátiles, ácidos grasos, índice de yodo y grado de acidez. El procedimiento de cada uno de las determinaciones se presenta en los siguientes acápite.

3.3.1 Ácidos grasos en aceites. El análisis de los ácidos grasos de cada muestra de aceite se llevó a cabo mediante la obtención, identificación y cuantificación de sus metilésteres. La obtención de los metilésteres se realizó siguiendo el procedimiento sugerido por la norma ISO 5509 "*Animal and Vegetal Fat and Oil-Preparation of Methyl Ester of Fatty Acids*" [33]; y la identificación se realizó, por cromatografía de gases de alta resolución con detector de ionización en llama (HRGC-FID), comparando los tiempos de retención de los metilésteres con los de patrones (Supelco). La cuantificación se realizó por el método del patrón interno, usando *n-hexadecano* (Merck, *Referente Substance for Gas Chromatography*) [42]. Las concentraciones relativas de cada uno de los ácidos grasos en las muestras de aceite se calcularon con base en la siguiente ecuación:

$$C_{AG} = \frac{C_{ISTD}}{A_{ISTD}} \times A_{FAME}$$

Donde C_{ISTD} y A_{ISTD} son la concentración (en mg/g de aceite) del patrón interno (*n*-hexadecano, Merck, *Referente Substance for Gas Chromatography*) y su respectiva área del pico cromatográfico (cuentas). A_{FAME} es el área del pico cromatográfico (cuentas) del metiléster del ácido graso.

El procedimiento para el análisis de cada muestra consistió en lo siguiente:

A la muestra de aceite (ca. 60 mg), contenida en un tubo de ensayo con tapa rosca, se agregó trifluoruro de boro en metanol al 20% (5 mL, Merck-Schuchardt). La mezcla se colocó, una vez sellada herméticamente, en un baño de aceite mineral a 85 ± 5 °C, durante 45 minutos para que transcurriera, con agitación magnética (200 rpm), la reacción de metilación de los ácidos grasos presentes en el aceite. Finalizado este período, se retiró el tubo de ensayo del baño de aceite, se dejó enfriar durante 25 min. Y los FAME's se extrajeron con 3 mL de hexano (Merck, *Referente Substance for Gas Chromatography*), agitándose la mezcla durante 1 min a 2000 rpm. Después de separar la fase orgánica de la metanólica, se colocaron, en un tubo cónico, una alícuota de la fase orgánica (0.5 mL) y un patrón interno, *n*-hexadecano (100 μ L, 7 mg/mL; Merck, *Referente Substance for Gas Chromatography*). La mezcla se aforó a 1 mL con hexano y se agitó durante 15 s a 2000 rpm. Para su respectiva identificación y cuantificación, se inyectaron 2 μ L de esta solución al cromatógrafo de gases con detector de ionización en llama (HRGC-FID). Los análisis se hicieron por triplicado.

El análisis se realizó en un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard (HP) 5890 A Series II (Palo Alto, California, EE.UU.), dotado con una columna capilar de sílice fundida HP-INNOWAX (60 m X 25 mm) recubierta con una fase estacionaria de

poli(etilenglicol) de 25 µm de espesor y equipado con un inyector automático HP 6890 y un detector de ionización en llama (FID). La presión de entrada del gas de arrastre (helio, 99.995 %, AGA Fano S.A.) en la cabeza de la columna fue de 200 kPa, y el modo de inyección fue *split* (relación 1:30). La programación de temperatura del horno fue de 100 °C (5 min) @ 2°C/min hasta 136 °C (5 ,min), luego @ 7 °C/min hasta 250 °C (25 min). Los flujos de los gases de combustión en el FID (270 °C), aire e hidrógeno, fueron 397 y 43 mL/min, respectivamente, y del gas auxiliar, nitrógeno (99.995 %, AGA Fano S.A.), fue de 25 mL/min.

Los datos obtenidos se procesaron usando del sistema de datos HP ChemStation Rev. A.05.05 [273].

3.3.2 Grado de acidez. El grado de acidez expresa el contenido, en porcentaje, de ácidos grasos libres en un aceite. En las muestras en estudio se determinó, disolviendo la muestra de aceite (*ca.*5 g) en una mezcla 1:1 de etanol/éter etílico (25mL, Merck, *Referente Substance for Gas Chromatography*) y, valorando posteriormente con solución etanólica de KOH (0.1 N) [41]. Como indicador se usó la fenolftaleína. Para el cálculo del grado de acidez, expresado en porcentajes de ácido oleico, se usó la siguiente ecuación:

$$\text{Grado de acidez} = \frac{VMN}{10 P}$$

Donde,

V = Volumen de la solución etanólica utilizada;

N = Normalidad de la solución de KOH utilizada;

M = Peso molecular del ácido oleico;

P = Peso (g) de la muestra utilizada.

Los análisis se realizaron por duplicado.

3.3.3 Índice de yodo. Para su determinación se pesó una muestra de aceite (200 mg) en un erlenmeyer de 300 mL, y se agregaron 15 mL de tetracloruro de carbono (Merck, *Referente Substance for Gas Chromatography*). A esta mezcla se adicionaron 25 mL de reactivo de Wijs (0.1 M de ICl_3); el frasco se tapó herméticamente protegiéndolo de la luz por espacio de una hora. Luego, se agregaron 20 mL de solución acuosa de yoduro de potasio (al 10%), y 150 mL de agua, y se valoró con tiosulfato de sodio 0.1N [41]; como indicador se usó engrudo de almidón. Posteriormente, se hizo un ensayo en blanco a las mismas condiciones, pero sin material graso. Los análisis se realizaron por duplicado. El cálculo del índice de yodo se efectuó con base en la siguiente ecuación:

$$\text{Índice de yodo} = \frac{12.69 N (V-V')}{P}$$

Donde,

P = Peso (g) de la muestra de aceite;

V = Volumen (mL) de la solución de tiosulfato sódico utilizado para el ensayo del blanco;

V' = Volumen (mL) de la solución de tiosulfato sódico utilizado para la materia grasa;

N = Normalidad de la solución de tiosulfato de sodio.

3.3.4 Análisis de aldehídos volátiles en aceites. Para el desarrollo de este método, se retomó parte de la metodología de un trabajo reportado en la literatura científica [34] referido al análisis de aldehídos en aceites. Los apartes del procedimiento tenidos en cuenta de este trabajo fueron el uso de la PFPH (Aldrich Co. Inc.), como agente derivatizante y la SPME en el modo *headspace*. El

método desarrollado por estos investigadores, que se reproduce parcialmente en este trabajo, consistió en la saturación de la fibra de PDMS-DVB con PFPH; su exposición al espacio de cabeza del aceite (temperatura superior a 170 °C), para derivar los aldehídos que se encontraban en fase vapor (derivación *in situ*), y desorción de los derivados en el puerto de inyección del cromatógrafo, para su respectivo análisis.

Por su parte, en el presente trabajo, los pasos seguidos para el desarrollo del método por HS/SPME/GC-ECD para la determinación de aldehídos fueron los siguientes:

- Selección de una de las fibras disponibles (PA, PDMS/DVB y PDMS);
- Establecimiento de las condiciones de operación para la absorción de PFPH sobre la fibra seleccionada;
- Síntesis del derivado del malondialdehído;
- Establecimiento de las condiciones operación para la derivación de los aldehídos con PFPH;
- Elaboración de la curva de calibración para los derivados hidrazónicos;
- Y, por último, la determinación de los aldehídos en los aceites comestibles.

La identificación de las hidrazonas se hizo con base en la comparación con los tiempos de retención de aldehídos patrón, derivados con PFPH (Aldrich Co. Inc.); y la cuantificación con la ayuda de una curva de calibración preparada sobre una solución oleosa. Esto último, para disminuir el efecto de la matriz.

Para la identificación, como para la cuantificación, sólo se tuvo en cuenta el pico cromatográfico correspondiente al isómero de mayor área, de las correspondientes hidrazonas, ésto es, el isómero *trans* [45]. La razón de lo anterior, es la mejora ostensible de la reproducibilidad del análisis.

Los equipos utilizados para la determinación de los derivados hidrazónicos fueron los siguientes:

Cromatógrafo de gases HP-5890 Serie II, dotado de un detector de captura de electrones, un inyector *split/splitless* y un sistema de datos HP ChemStation rev. A.0.5.01. Se usó una columna capilar de sílice fundida con fase estacionaria de 5%-fenil-poli(dimetilsiloxano) de 30 m x 0.32 mm (di) x 0.25 μ m (espesor de la fase estacionaria).

Los parámetros operacionales del análisis fueron los siguientes:

- ✓ Flujo del gas de purga de *septum*: a 2 mL/min;
- ✓ Relación *split*: 1:13;
- ✓ Temperatura del puerto de inyección: 250°C;
- ✓ Programación de temperatura del horno: desde 110 °C hasta 250 °C (4min) @ 10 °C/min;
- ✓ Temperatura del detector: 280°C;
- ✓ Flujo de gas auxiliar para el ECD: 60 mL/min (argón, 99.995 %, AGA Fano S.A.);
- ✓ Flujo del gas de arrastre: 10 mL/min (Helio, 99.995 %, AGA Fano S.A.);
- ✓ Presión de entrada en la cabeza de la columna: 100 kPa.

A continuación, se detallan cada uno de los pasos seguidos para el desarrollo del trabajo.

3.3.4.1 Selección de la fibra. Se evaluaron tres recubrimientos de fibra, los cuales fueron seleccionados con base en su naturaleza polar, a saber: Poli(acrilato) (PA, espesor de 85 μ m, polar), Poli(dimetilsiloxano) (PDMS, de espesor de 100 μ m, apolar) y poli(dimetilsiloxano)/divinilbenceno (PDMS-DVB, de

espesor 65 μm , medianamente polar). Las fibras utilizadas se obtuvieron de Supelco.

Se seleccionó la fibra que posee mayor afinidad para atrapar el agente derivatizante (PFPH, Aldrich Co. Inc.). Ésto se evaluó ubicando la fibra en el espacio de cabeza de 2 mL de una solución acuosa de PFPH (0.1 mM; de agua grado HPLC, Mallinckrodt) contenidos en un recipiente de ámbar de 4,5 mL. Los períodos de exposición fueron 10 y 60 minutos. El procedimiento seguido se describe a continuación:

Se vertieron 2 mL de solución acuosa de PFPH (0.1 mM) a un frasco ámbar de 4.5 mL, con tapa rosca y *septum* de poli(tetrafluoretileno) y silicona blanca. Luego, se tapó el frasco, la solución se agitó a 900 rpm (Thermolyn, Nuovo II Stirring Hot plate, Dubuque, IA, USA) y, un minuto después se perforó el *septum* y se expuso la fibra al espacio de cabeza. Para cada fibra, se hicieron pruebas con 10 y 60 minutos de exposición. La temperatura de la prueba fue de 30 °C. Culminado el tiempo de exposición, se retrajo la fibra y se llevó al puerto de inyección del cromatógrafo de gases para su desorción por 5 minutos, tiempo suficiente para la desorción de analitos y la limpieza de la fibra. Todas las pruebas se hicieron por triplicado.

3.3.4.2 Condiciones de absorción de la PFPH. Una vez escogido el recubrimiento polimérico se procedió a evaluar el tiempo de extracción de la PFPH (Aldrich Co. Inc.) a partir de soluciones de diferentes concentraciones. Todas las pruebas se realizaron a una temperatura de 30°C y una agitación magnética de 900 rpm.

Para establecer estas condiciones, primero, se procedió a registrar, para la fibra seleccionada, la cantidad de PFPH (Aldrich Co. Inc.) extraída del espacio de

cabeza de una solución acuosa de PFPH (0.1 mM), durante su exposición de 10, 20, 40, 50, 60 y 80 minutos. Con base en las pruebas anteriores se elaboró la curva de saturación de la fibra con PFPH (Aldrich Co. Inc.); con base en esto se determinó, para las condiciones dadas, el tiempo y la cantidad con la cual la fibra se satura con el agente derivatizante. La cantidad de PFPH extraída en el tiempo se cuantificó con base en las áreas cromatográficas en cuentas. Los resultados permitieron establecer la curva de absorción de PFPH con el tiempo de exposición. El procedimiento seguido se describe a continuación:

Se vertieron 2 mL de solución acuosa de PFPH (0.1 mM) a un frasco ámbar de 4.5 mL, con tapa rosca y *septum* de poli(tetrafluoretileno) y silicona blanca. La solución se tapó y se agitó a 900 rpm, en un agitador magnético Thermolyn (Nuovo II Stirring Hot plate, Dubuque, IA, USA). Un minuto después de iniciada la agitación, se perforó el *septum* y se expuso la fibra al espacio de cabeza de la solución durante 10 minutos. Culminado el tiempo de exposición, se retiró la fibra y se llevó al puerto de inyección del cromatógrafo de gases para su desorción (5 minutos). Este procedimiento se repitió para 20, 40, 50, 60 y 80 minutos de exposición al espacio de cabeza. La temperatura de la solución fue de 30°C y las determinaciones se realizaron por triplicado.

El procedimiento anterior, de saturación de la fibra, se realizó también con una solución de PFPH de 0.8 mM. En esta prueba, los tiempos de exposición evaluados fueron 4, 6 y 12 minutos. Estas últimas pruebas se hicieron por duplicado.

Con base en las dos pruebas anteriores, se escogió el tiempo de exposición de la fibra y la concentración de la solución de PFPH a utilizar.

3.3.4.3 Síntesis del derivado del malondialdehído. Para la determinación del malondialdehído, se sintetizó su derivado de acuerdo con el procedimiento reportado en la literatura científica [43]. Éste consistió en agregar lentamente 2.9 mL de 1,1,3,3-tetrametilpropano a 50 mL de una solución etanólica con 2.5 g de PFPH y 2 mL de ácido clorhídrico concentrado. La mezcla reaccionó durante 2 horas bajo reflujo. Concluido el tiempo de reacción, de la mezcla se evaporó el solvente con un flujo constante de nitrógeno. El residuo fue destilado bajo presión reducida y la fracción recolectada a 96 °C (y presión menor de 3 torr) se analizó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

El equipo utilizado para el análisis de la fracción recolectada fue un cromatógrafo de gases (Agilent Technologies 5973) acoplado a un detector selectivo de masas (impacto de electrones, 70 eV). El sistema para el análisis de datos fue un HP MSChemStation. Puerto de inyección *split/splitless* (250 °C, relación *split* 1:30), la columna cromatográfica fue DB-5MS (60m x 0.25mm x 0.25 µm)

Las condiciones operacionales del análisis fueron las siguientes:

- ✓ Flujo del gas de purga de *septum*: 2 mL/min;
- ✓ Relación *split* 1:30;
- ✓ Temperatura del puerto de inyección: 250°C.
- ✓ Programación de temperatura del horno: desde 50 °C (5 min) hasta 270 °C (10 min) @ 5 °C/min;
- ✓ Temperatura de la interfase: 285°C;
- ✓ Temperatura de la cámara de ionización: 230°C;
- ✓ Flujo del gas de arrastre: 1.0 mL/min (Helio, 99.995 %, AGA Fano S.A.);
- ✓ Presión de entrada en la cabeza de la columna: 200 kPa

3.3.4.4 Condiciones de derivación de los aldehídos. Una vez fijados el tiempo de exposición de la fibra y la concentración de PFPH de la solución a utilizar, se procedió a estudiar la cinética de derivación de los aldehídos bajo las siguientes condiciones: tiempo de reacción, nivel mínimo de detección y la linealidad del método. Además, se tuvieron en cuenta las posibilidades de trabajo, que ofrece la microextracción en fase sólida, en cuanto a llevar a cabo el proceso en condiciones de equilibrio o de no equilibrio.

El procedimiento consistió en saturar la fibra con el agente derivatizante con posterior exposición al espacio de cabeza de 2 mL de una solución oleosa de aldehídos, durante diferentes períodos de tiempo. La derivación se llevó a cabo directamente sobre la fibra, y al término del período de exposición, los derivados hidrazónicos se desorbieron en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases, para su respectivo análisis.

El procedimiento se aplicó a las soluciones oleosas tanto de aldehídos saturados, como insaturados.

Estas soluciones se prepararon agregando alíquotas de una solución de aldehídos en metanol de 17.5 $\mu\text{mol/mL}$ a un balón aforado de 10 mL, que contenía aceite vegetal comestible. Los aldehídos saturados fueron etanal, propanal, butanal, pentanal hexanal, octanal, nonanal y decanal, mientras que los insaturados fueron acroleína, crotonaldehído, *trans*-2-pentenal *trans*-2-hexenal, *trans*-2-heptenal y *trans*-2-octenal (Supelco). En el caso de la determinación del malondialdehído, se sintetizó previamente su derivado hidrazónico y, luego, se agregó a la solución oleosa.

Para la selección de las condiciones de derivación de los aldehídos se realizaron las siguientes curvas de calibración: una curva de concentración de aldehídos en aceite (de 0.1, 0.5 y 1.0 μM , y el blanco), con un tiempo de exposición de la fibra

(saturada previamente con PFPH) de 40 minutos, al espacio de cabeza de la solución oleosa de aldehídos.

Debido a que el coeficiente de correlación de esta primera curva fue bajo, y a que los puntos no mostraban una tendencia, quizá, por causa de fenómenos de competencia y desorción de los derivados. Por lo anterior, se procedió a realizar una segunda curva de calibración. En ésta se amplió el intervalo de concentraciones de las soluciones oleosas de 0.1 – 1.0 μM a 0.1 - 5.0 μM . Las soluciones de esta prueba fueron de 0.1, 0.5, 1.0, 3.0 y 5.0 μM . Además, en esta prueba se redujo el tiempo de exposición de la fibra a 15 minutos.

Aunque en la segunda curva de calibración se mejoró la correlación entre la variables estudiadas y se pudo registrar una marcada tendencia, esto no fue suficiente, por lo que se determinó realizar una tercera prueba, la cual se describe a continuación: la fibra previamente seleccionada y saturada con PFPH se expuso al espacio de cabeza, por diferentes períodos (1, 3, 15, 20 y 40 min), de un aceite calentado 15 horas a 190 ± 2 °C. Después de retirar la fibra, ésta se introdujo al puerto de inyección del cromatógrafo; y con el registro del cromatograma (área) se graficó una curva, relacionando área y tiempo de exposición. Todos los análisis de estas tres pruebas se hicieron por duplicado.

3.3.4.5 Curva de calibración. Con base en los ensayos anteriores se establecieron las siguientes condiciones, tanto de absorción de la PFPH, como de derivación de la misma, a saber:

- Fibra usada: poli(dimetilsiloxano)/divinilbenceno (PDMS/DVB, de espesor 65 μm)

- Condiciones de absorción: volumen de la solución de PFPH: 2 mL; concentración de la solución de PFPH: 0.8 mM; agitación: 900 rpm; y tiempo de absorción de PFPH: 4 min.
- Condiciones de derivación con PFPH: agitación: 900rpm; tiempo de derivación: 1 min;

La temperatura del análisis fue 30 °C, y el tiempo de cada análisis fue aproximadamente de 25 min.

Posteriormente, se procedió a preparar la curva de calibración, tal como se describe a continuación: se saturó la fibra con PFPH y se expuso al espacio de cabeza de 2 mL de solución oleosa (durante 1 min) para obtener los correspondientes derivados y, paso seguido, llevar la fibra al puerto de inyección del cromatógrafo de gases para su respectivo análisis. Las soluciones oleosas de aldehídos usadas fueron de concentraciones de 0.3, 0.5, 15, 50, 70 y 100 μM (y el blanco).

4. RESULTADOS Y ANÁLISIS

En este capítulo se presentan y se discuten los resultados del desarrollo de un método para el análisis de aldehídos en aceites comestibles por SPME en modo *headspeace*, con derivatización simultánea sobre la fibra. También se presentan los resultados del análisis de cuatro aceites comestibles, de mayor consumo en la ciudad de Bucaramanga. El trabajo se llevó a cabo en las siguientes etapas:

- Selección de los aceites a estudiar;
- Tratamiento térmico de las muestras de aceites seleccionados;
- Análisis de las muestras de aceite, a saber: ácidos grasos (en forma de sus metilésteres), grado de acidez, índice de yodo y la cuantificación de aldehídos volátiles.

4.1 SELECCIÓN DE LOS ACEITES

Para el estudio de la degradación térmica oxidativa de aceites comestibles se compararon cuatro de los aceites más usados en la fritura de alimentos en Bucaramanga. La selección de los aceites se basó en una encuesta, que se hizo a los vendedores de las llamadas comidas “rápidas”, que se ubican en las horas nocturnas en los andenes de la ciudad. Los sectores escogidos fueron: los alrededores de la UIS, el retorno del Estadio municipal Alfonso López, la avenida González Valencia y alrededores de la cancha del barrio Girardot. La encuesta consistió en unas preguntas referentes al tipo de aceite que se usa y a las razones para esta selección (ver **Anexo 1**): ¿Qué marca de aceite prefiere para la fritura de los productos que ofrece?, y ¿Por qué? Los resultados se presentan en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Resultados de la encuesta realizada, para seleccionar los aceites a evaluar su degradación térmica.

Marca usada	Frecuencia de uso	%	Razones porqué se usan (para todos los aceites)
Búcaro*	12	29	
Oleosander	8	19	
Andaluz*	4	10	
Oleocali*	4	10	
Oliosoya*	3	7	No se quema
Cocinador	2	5	Rinde más
Coposa	2	5	Es mejor
Riquísimo	1	2	Mejor sabor
Argo	1	2	Mejor olor
Del Llano	1	2	Más económico
Fritemos	1	2	La presentación
Purísimo	1	2	El color
Rendidor	1	2	
Zeta	1	2	
Nº de encuestas	42	100	

* Aceites seleccionados para el estudio.

Las cuatro marcas de aceite más usadas entre los vendedores de comidas “rápidas” encuestados fueron, en orden descendente, las siguientes: Búcaro, Oleosander, Andaluz y Oleocali. Las dos primeras son producidas por industria Saceites S.A., ubicada en el parque industrial de Chimitá; el aceite Andaluz es producido en Barranquilla por la industria Gradesa S.A.; y el aceite Oleocali lo produce en el Valle la empresa Industrias Llorreda. En la lista de los seleccionados para llevar a cabo el presente estudio sólo estuvieron las marcas

Búcaro, Andaluz, Oleocali y Oliosoya. Este último se incluyó porque no se encontró una presentación adecuada del aceite Oleosander (se ofrece sólo en cantinas de 18 litros). El aceite Oliosoya es producido en Buga por la industria Grasas S.A.

A continuación, se presenta la información suministrada por el fabricante de cada uno de los aceites seleccionados.

Tabla 5. Información suministrada por el fabricante de cada uno de los aceites seleccionados en este estudio.

Propiedad	Búcaro	Andaluz	Oleocali	Oliosoya
Fuente	Soya y oleína de palma	ND	Soya y/o oleína de palma y/o algodón	Mezcla de aceites vegetales
Antioxidantes, y otros aditivos	BTH, TBHT, ácido cítrico, β-caroteno y vitamina E	ND	BTH y/o TBC, ácido cítrico	TBHQ y vitamina E
Contenido de ácidos insaturados	14%	ND	ND	24%
Contenido de ácidos saturados	86%	ND	ND	76%
Productor	Saceites S.A. (Bucaramanga)	Gradesa S.A. (Barranquilla)	Lloreda (Valle y Barranquilla)	Grasas S.A. (Buga)

ND: Información no disponible.

4.2 TRATAMIENTO TÉRMICO DE LOS ACEITES

De cada uno de los aceites seleccionados, se tomaron 4 porciones de 80 mL, y cada una de estas alíquotas se calentó a 190 ± 2 °C, durante 0, 3, 6 y 9 horas, respectivamente. Las muestras se calentaron en vasos de precipitados de 100 mL, quedando la superficie del aceite expuesta al aire atmosférico. Al final del período de calentamiento, las muestras se almacenaron en frascos ámbar a una temperatura de 4 °C, hasta su análisis respectivo.

4.3 ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS DE ACEITE

A cada una de las muestras de aceite tratadas se les hicieron las siguientes determinaciones:

- Ácidos grasos (en forma de sus metilésteres);
- Grado de acidez;
- Índice de yodo;
- Aldehídos volátiles.

En las siguientes secciones se presentan los resultados de cada uno de los análisis realizados.

4.3.1 Ácidos grasos en aceites. El procedimiento cómo se realizaron los análisis de ácidos grasos se describe en el capítulo 3, que corresponde a la metodología. Se resalta, que el análisis de los ácidos grasos de cada una de las muestras de aceite se llevó a cabo mediante la obtención, identificación y cuantificación de sus metilésteres. En la siguiente tabla se presentan los resultados obtenidos para los aceites seleccionados antes de ser sometidos al tratamiento térmico.

Los resultados, presentes en la **Tabla 6**, demuestran que existe una similitud entre los aceites Búcaro, Andaluz y Oleocali, en cuanto a la composición de ácidos

grasos mayoritarios, ésto es: ácido palmítico, oleico, linoleico y esteárico. Por su parte, el aceite Oliosoya contiene mayoritariamente los mismos ácidos, más el ácido linolénico, pero en proporciones diferentes. Para este aceite, se observan, las concentraciones altas de los ácidos oleico y linoleico, comparado con las de los otros aceites. Los resultados de la determinación de FAME`s, para los aceites tratados térmicamente, se presentan en las **Figuras 12 y 13** y en el **Anexo 2**.

Tal como se ilustra en las **Figura 12 y 13**, existe una tendencia hacia el descenso de la concentración de los ácidos grasos insaturados, principalmente, oleico y linoleico, cuando el tiempo de calentamiento se extiende; lo anterior ocurre precisamente por la presencia de enlaces dobles, que aumentan la susceptibilidad de estos ácidos a la oxidación. En la **Figura 14** se presentan la evolución del contenido de ácidos grasos saturados e insaturados, para cada aceite, durante su calentamiento. Allí se observa más claro, la facilidad con que se oxidan los ácidos grasos insaturados con respecto a los saturados.

En la **Figura 14**, también se presentan datos referentes al porcentaje de degradación de los ácidos grasos (saturados e insaturados) de cada muestra, con respecto a su blanco (aceite sin calentar, 0 horas). Si se acepta, que el error promedio de cada análisis es = 8%, lo cual es cierto para los ácidos grasos mayoritarios (ver **Anexo 3**), a partir de los resultados presentes en la **Figura 14**, se puede afirmar estadísticamente representativo lo siguiente:

- Los ácidos grasos saturados básicamente no sufren degradación oxidativa bajo las condiciones empleadas, puesto que no se observa, en las muestras de aceites calentados, cambio alguno en la concentración de sus FAME`s, después de calentar el aceite durante 3, 6 ó 9 horas a 190 ± 2 °C.

Tabla 6. Composición de ácidos grasos, en forma de sus FAME`s, de los aceites seleccionados.

Ácido graso	Aceite comestible							
	Búcaro		Andaluz		Oleocali		Oliosoya	
	%p/p ¹	CV,%	%p/p ¹	CV,%	%p/p ¹	CV,%	%p/p ¹	CV,%
Caprílico	ND	---	ND	---	ND	---	ND	---
Nonanoico	ND	---	ND	---	ND	---	ND	---
Cáprico	ND	---	ND	---	ND	---	ND	---
Undecanoico	ND	---	ND	---	ND	---	ND	---
Láurico	0.1	2.2	0.2	3.2	0.2	1.9	ND	---
Tridecanoico	ND	---	ND	---	ND	---	ND	---
Mirístico	0.5	2.0	0.7	4.1	0.7	1.9	0.1	6.4
Pentadecanoico	0.0	4.2	0.0	4.4	0.0	4.9	ND	---
Palmítico	23.3	5.5	30.6	3.4	27.5	3.0	9.1	6.8
Palmitoleico	0.1	3.7	0.1	3.6	0.1	3.0	0.1	19.4
Heptadecanoico	0.1	5.0	0.1	4.4	0.1	2.8	0.1	6.9
Estearico	3.1	7.7	3.2	5.8	3.4	3.7	2.6	7.8
Oleico	27.8	8.0	33.3	6.7	33.0	4.1	16.6	7.6
Linoleico	14.4	7.5	7.2	7.7	11.0	4.1	36.6	7.5
Nonadecanoico	ND	---	ND	---	ND	---	ND	---
Linolénico	0.8	8.3	0.1	15.9	0.4	7.4	3.2	7.5
Araquídico	0.3	10.4	0.3	7.6	0.3	4.5	0.4	8.1
Eicosanoico	0.1	13.9	0.1	11.6	0.1	7.4	0.2	8.5
Eneicosanoico	ND	---	ND	---	ND	69.4	0.0	18.1
Behénico	0.1	14.7	0.1	23.7	0.2	57.3	0.4	10.1
Erúcico	ND	---	ND	---	ND	---	ND	---
Nervónico	ND	---	ND	---	ND	---	ND	---

¹ % P/P, g de metiléster por cada 100 g de aceite.

² CV, coeficiente de variación (n = 3).

ND: No detectado

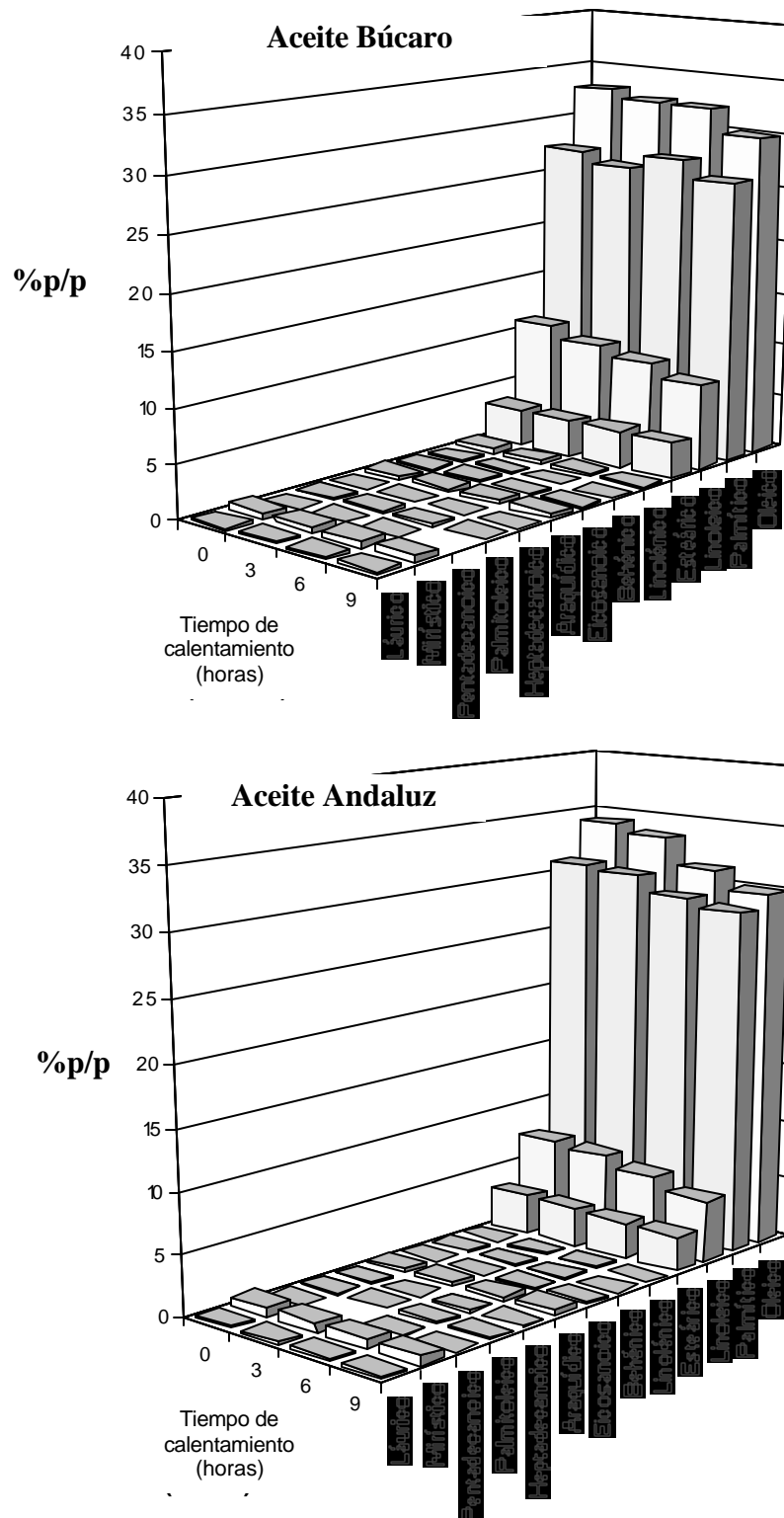
- Para los aceites Búcaro, Oleocali y Oliosoya, sólo se observó un cambio en la concentración de los ácidos grasos insaturados cuando la muestra se calentó durante 9 horas o más; y para el caso del aceite Andaluz, a partir de 6 horas.
- El orden descendente de estabilidad térmica (oxidativa) de los ácidos grasos insaturados en los aceites fue el siguiente: Búcaro > Oleocali > Andaluz > Oliosoya; aunque las diferencias entre ellos no fueron significativas (alrededor del 10%).

Sobre la última afirmación, es necesario recordar, que precisamente el aceite con mayor contenido de insaturados, el Oliosoya, fue el que mayor degradación térmica oxidativa experimentó (18%).

Con respecto a los resultados globales del análisis de FAME`s en las muestras de aceites, en la **Figura 14** se presenta información que indica sobre la estabilidad térmica de estos aceites. Por ejemplo, y siguiendo aceptando que el error de cada análisis es menor de 8%, se registra que el aceite que primero se degradó fue el aceite Andaluz. Ésto se pudo presenciar apenas a las 6 horas de calentamiento, mientras que para los otros aceites fue a las 9 horas de calentamiento. Pareciera que el período de inducción para el aceite Andaluz es más corto que el de los otros aceites, o que los otros aceites tienen mayor concentración de antioxidantes (esto último no se determinó en este trabajo).

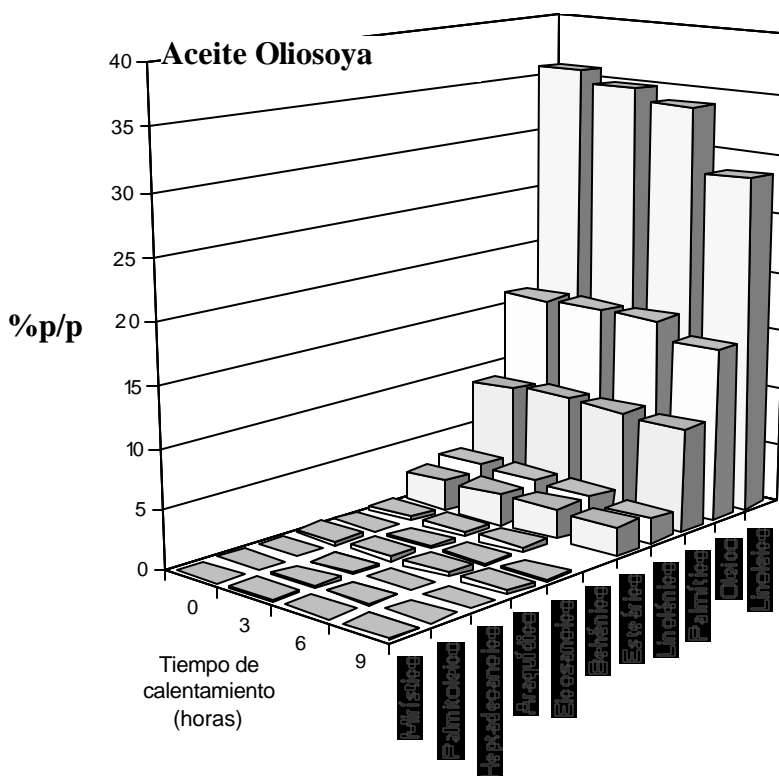
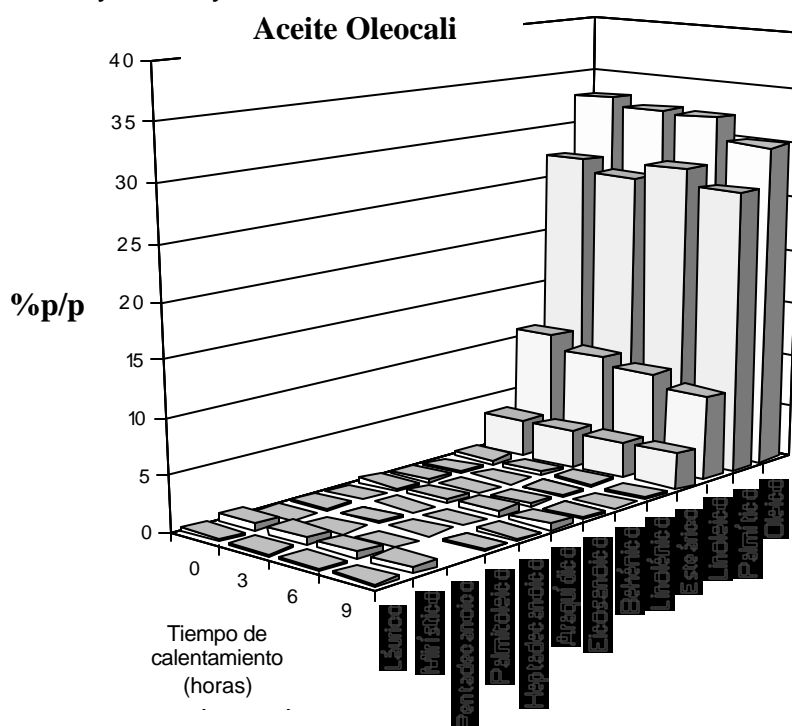
Después de superado el período de inducción, la degradación oxidativa de los ácidos grasos se desborda en los aceites Búcaro, Oleocali y Oliosoya, a tal punto, que a las nueve horas de calentamiento, el aceite Oliosoya se ha degradado más que el mismo aceite Andaluz; en el caso de los aceites Búcaro y Oleocali, sus respectivas diferencias con el aceites Andaluz tienden a reducirse (ver **Figura 14**). Si continuara esta tendencia, es razonable afirmar sobre la existencia de un tiempo, a partir del cual, el aceite Andaluz presenta menor oxidación que los demás aceites bajo estudio, como ya ha ocurrido con el aceite Oliosoya.

Figura 12. Evolución de la composición de ácidos grasos (determinados en forma de sus FAME's), con el tiempo de calentamiento (190 ± 2 °C), en los aceites Búcaro y Andaluz.



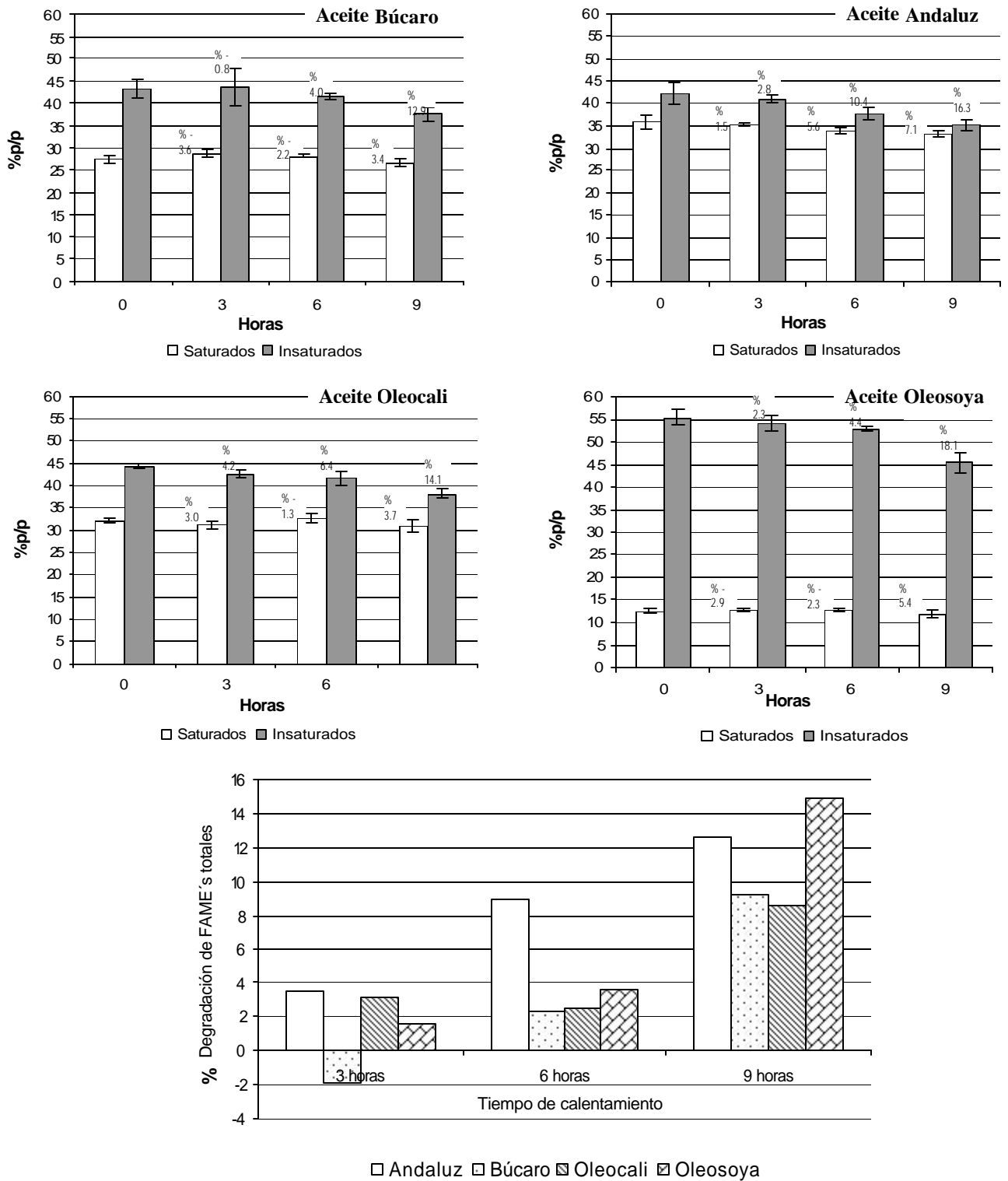
%p/p, g, FAME/g, aceite.

Figura 13. Evolución de la composición de ácidos grasos (determinados en forma de sus FAME`s), con el tiempo de calentamiento ($190 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$), en los aceites Oleocali y Oliosoya.



%p/p, g, FAME/g, aceite.

Figura 14. Evolución de la composición de los ácidos grasos saturados e insaturados (en su forma de FAME`s), con el tiempo de calentamiento. Porcentaje de degradación, de los FAME`s totales, con respecto al aceite sin calentar .



Nota: %, Los porcentajes sobre las barras corresponden a la degradación con respecto al aceite sin calentar

Lo expuesto en el anterior párrafo se puede explicar con base en dos criterios, a saber: el contenido de antioxidantes y el porcentaje de ácidos grasos saturados (o insaturados). El contenido de antioxidantes se refleja en la diferencia entre los períodos de inducción de degradación de cada aceite, es decir, entre el aceite Andaluz, por un lado, y los aceites Búcaro, Oleocali y Oliosoya, por otro; es de anotar, que el fabricante no suministra información sobre la adición del algún antioxidante al aceite Andaluz, ni sobre el contenido en ácidos grasos (ver **Tabla 5**).

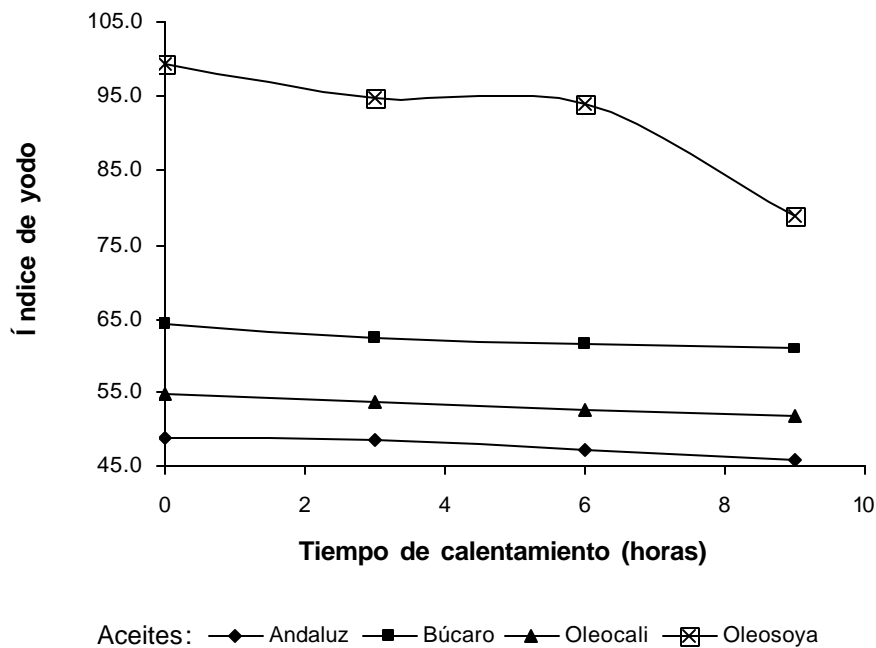
4.3.2 Índice de yodo. Esto es una propiedad, que evalúa el número de insaturaciones en el aceite. En este trabajo, se usó como un método más, que puede dar una idea sobre el grado de oxidación lipídica de cada aceite, que se pone de manifiesto con la disminución del número de insaturaciones. Además, el índice de yodo es un buen indicador con el que se buscaría encontrar las correlaciones con los resultados de la determinación de aldehídos en el aceite, con el fin de evaluar la posibilidad que los aldehídos puedan ser usados para un diagnóstico del estado de degradación del aceite.

Los resultados del índice de yodo, de cada uno de los aceites estudiados, se presentan en la **Figura 15**.

Los resultados de la **Figura 15** presentan dos coincidencias con los del análisis de FAME's, que son: la diferencia marcada entre el aceite Oliosoya y los demás aceites, en términos del contenido de ácidos grasos insaturados (ver **Figura 14**), en el caso del análisis de FAME's; y en términos del número de insaturaciones, en el caso del índice de yodo (ver **Figura 15**). La segunda coincidencia consiste en la tendencia descendente de estos dos índices. Lo anterior es consistente con lo reportado en otros trabajos [19-21], es decir, que el tiempo de calentamiento influye sobre el grado de deterioro del aceite y, en específico, sobre la

degradación de aquellos lípidos con insaturaciones. No se debe olvidar, que tanto el análisis de FAME's, como la medición del índice de yodo, permiten hacer un estimativo de la variación del número de enlaces dobles, donde transcurre más probablemente la oxidación [16].

Figura 15. Índice de yodo de las muestras de aceites calentados ($190 \pm 2^\circ\text{C}$).

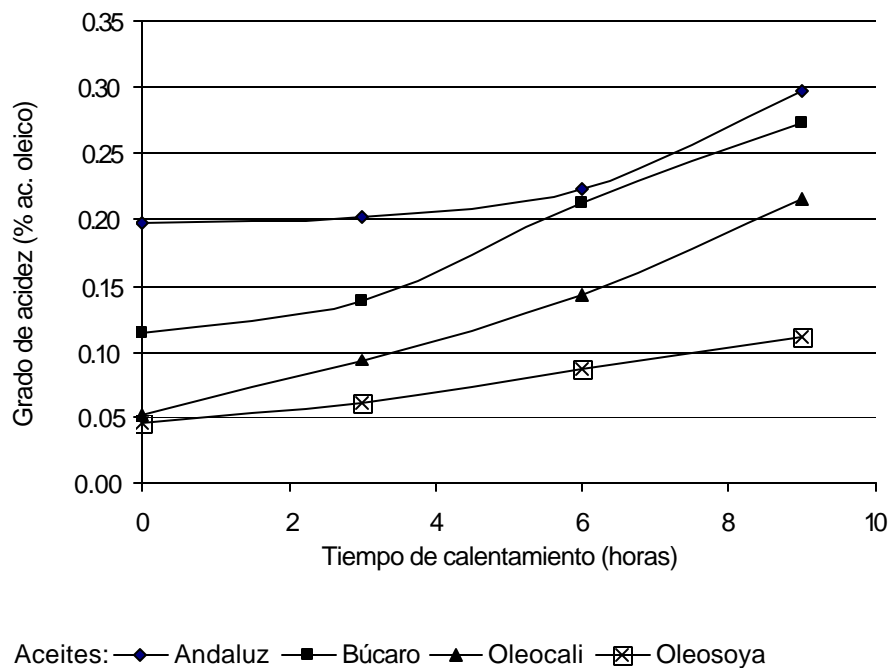


Los resultados del índice de yodo dejan ver también, que hay una diferencia notable, entre el aceite Oliosoya y los demás aceites, en términos de oxidación térmica. Obsérvese, que la intensidad de la disminución del índice de yodo con el tiempo de calentamiento es más intensa en el caso del aceite Oliosoya, que para el caso de los otros tres aceites (ver **Figura 15**).

4.3.3 Grado de acidez. Este análisis mide la acidez del aceite y se expresa en términos de % del ácido oleico. En los aceites, la acidez suele incrementarse

cuando éste se somete a temperaturas altas por largos períodos de tiempo, y es por eso que puede ser usado como indicador del grado de deterioro de los aceites. Principalmente la acidez al aceite se la confieren los ácidos grasos libres, productos de la hidrólisis del enlace éster de los lípidos; también algunos productos finales de la oxidación sobre las insaturaciones de los gliceroles. La acidez influye sobre el punto de humo de los aceites, disminuyéndolo; este punto se entiende como la temperatura mínima en la que el aceite empieza a producir humo. En los aceites usados en este trabajo no se alcanzó el punto de humo, a pesar de que los resultados mostraron el incremento del grado de acidez de aceites a medida que se extendía el tiempo de su calentamiento (ver **Figura 15**).

Figura 16. Grado de acidez de las muestras de aceites calentados ($190 \pm 2^\circ\text{C}$).



Los resultados obtenidos en el grado de acidez (ver **Figura 16**) indican que el aceite Oliosoya es el que se hidroliza con menor facilidad, es decir, es más estable a la reacción de hidrólisis de los ésteres.

Por tanto, se puede afirmar, que el aceite Oliosoya es más estable, que los otros aceites, a las reacciones de hidrólisis; mas no se puede afirmar lo mismo con respecto a su estabilidad a las reacciones de oxidación, donde el aceite Andaluz, Búcaro y Oleocali presentan estabilidad más alta.

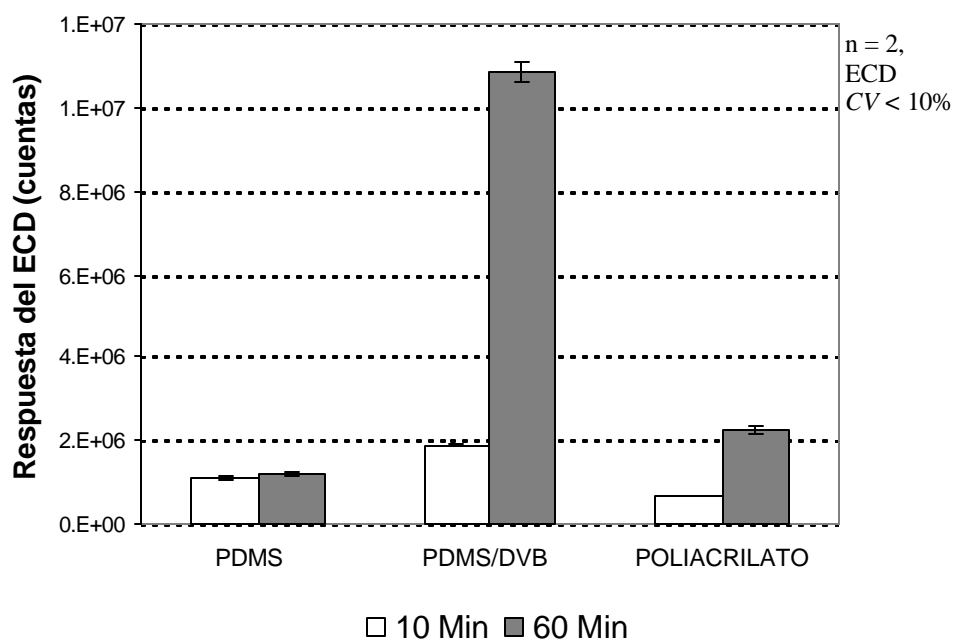
Por último, ninguno de los aceites estudiados alcanzó a tener, con los tratamientos realizados, grados de acidez por encima de los límites estipulados en las reglamentaciones de Colombia, Europa y Chile, que se refieren al control de los aceites usados, cuyos límites permitidos, en términos de % de ácido oleico son 0.5, 0.8 y 2.5 %, respectivamente [28-30].

4.3.4 Determinación de aldehídos volátiles en aceites. Para la determinación de los aldehídos volátiles en aceites se empleó un método por SPME en el modo *headspeace* con derivación sobre la fibra. Los resultados de cada uno de los pasos que se dieron, se presentan en las siguientes secciones.

4.3.4.1 Selección de la fibra. De los tres recubrimientos de fibras de SPME (PA, PDMS/DVB y PDMS) usadas en este trabajo, el de polaridad intermedia fue el que retuvo mayor cantidad de PFPH a las condiciones de la prueba, tal como se ilustra en la **Figura 17**. Ante esto, se seleccionó la fibra de poli(dimetilsiloxano)/divinilbenceno (PDMS/DVB, de espesor 65 μm) para el desarrollo del método.

La explicada diferencia ostensible entre la fibra de PDMS-DVB y las otros dos (PDMS y PA) con respecto a la cantidad de PFPH que se depositó (ver **Figura 17**), puede ser por la afinidad entre los grupos aromáticos del polímero de PDMS-DVB y de la PFPH. Precisamente, como el resultado de esta afinidad es que se escogió la fibra de PDMS-DVB para las pruebas que se analizan a continuación, en el método desarrollado.

Figura 17. Comparación de la cantidad de PFPH retenida sobre las tres fibras (PDMS, PDMS-DVB, PA).



Un parámetro importante a tener en cuenta en el desarrollo de este método, es el tiempo de análisis, que debe ser preferiblemente el más corto posible. Para esto, se tiene que combinar entre el tiempo de exposición para depositar el agente derivatizante sobre la fibra y su cantidad.

Aunque es importante para el desarrollo de un método de análisis ágil por SPME, –con derivación sobre la fibra-, que el tiempo requerido para alcanzar la saturación de la fibra, a unas condiciones dadas, sea reducido, existe en este caso un condicionamiento, y es la necesidad de no limitar la reacción de derivación completa de los aldehídos por falta de PFPH. Lo anterior se afirma a raíz de que los resultados muestran, que el polímero de PDMS a los 10 min está próximo a la

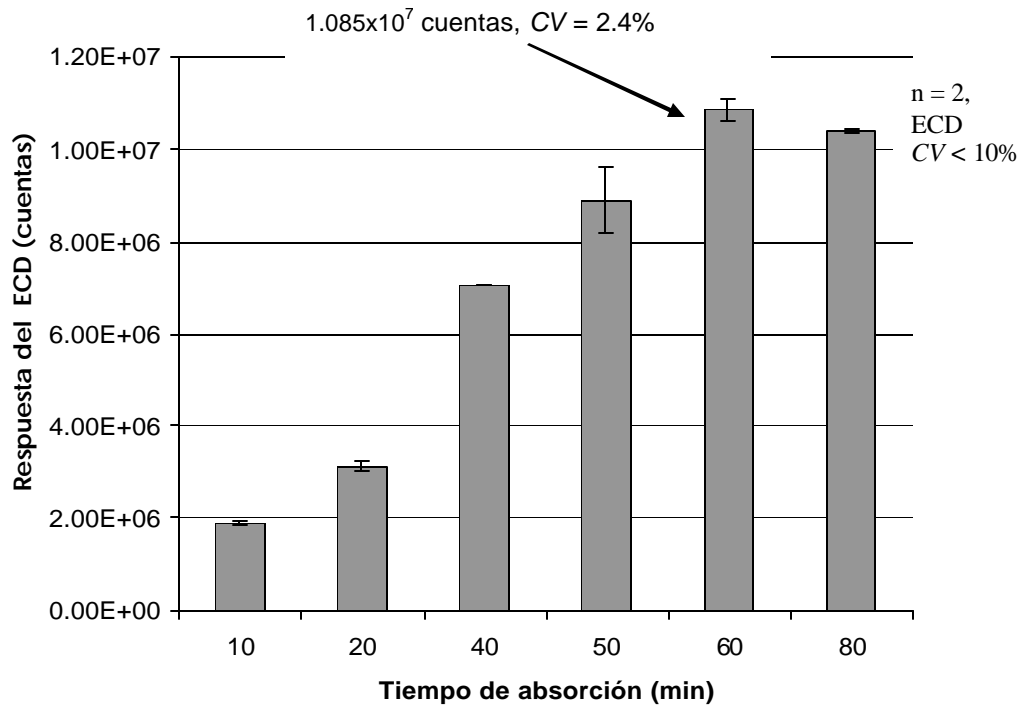
saturación, pero la cantidad de PFPH que se deposita sobre el es menor que la que se deposita sobre el recubrimiento de PDMS-DVB, durante el mismo tiempo de exposición. La capacidad de este recubrimiento para retener la PFPH, también es más alta que la del recubrimiento de poli(acrilato) (PA) (ver **Figura 17**).

Por último, es necesario señalar que la fibra de PDMS-DVB ya se ha usado para la determinación de aldehídos a través de la derivación con PFPH [34]; lo que le da más peso a la decisión de escogerla para el propósito de desarrollar un método para la determinación de aldehídos en aceites calentados.

4.3.4.2 Condiciones de absorción de la PFPH. Las condiciones adecuadas para la absorción de PFPH por parte de la fibra de PDMS-DVB se buscaron con dos pruebas, éstas son: curva de saturación de la fibra con PFPH y reducción del tiempo de exposición de la fibra al espacio de cabeza de la solución que contiene PFPH. La curva de saturación se elaboró exponiendo la fibra de PDMS-DVB al espacio de cabeza de una solución acuosa de PFPH (2 mL, 0.1 mM) durante varios intervalos de tiempo (10, 20, 40, 60 y 80 min). A continuación, se presentan los resultados de la curva de saturación.

Lo que se buscó con esta prueba fue determinar el tiempo de saturación (con PFPH) de la fibra, y la cantidad de PFPH depositada sobre ella en la saturación; todo a las condiciones de la prueba. Del tiempo de saturación, se puede afirmar, teniendo en cuenta los resultados obtenidos (ver **Figura 18**), que a los 60 min de exposición de la fibra al espacio de cabeza de la solución, ésta ya ha alcanzado la saturación. A los 80 min de exposición, en la fibra ya no se deposita mayor cantidad de PFPH, en cambio, se observa una pequeña pérdida.

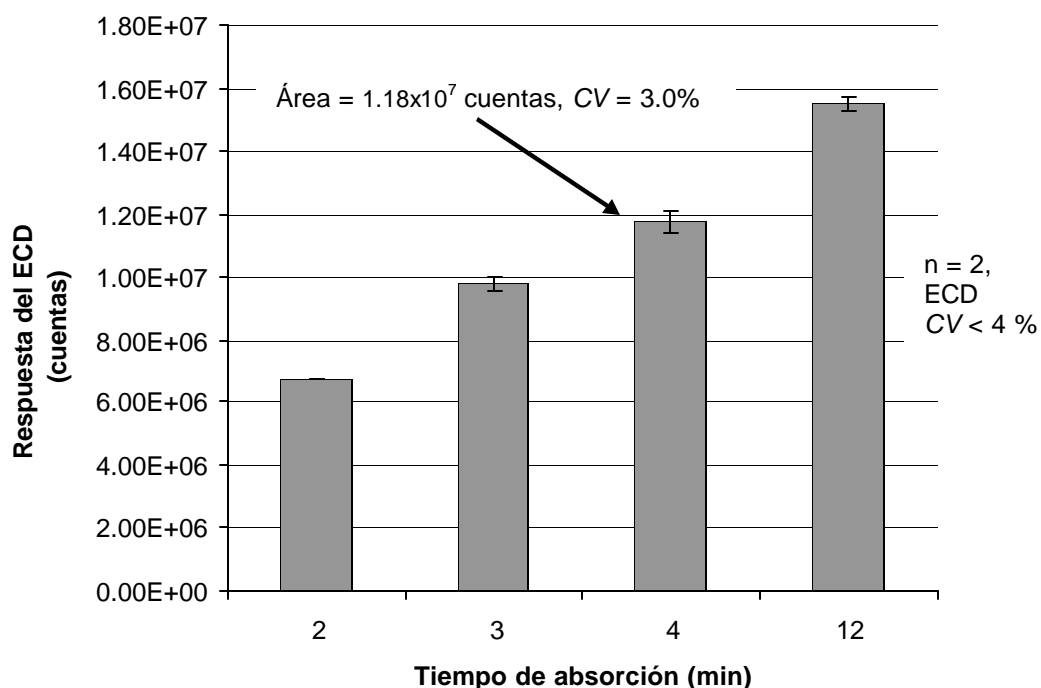
Figura 18. Curva de saturación de la fibra de PDMS-DVB con PFPH.



En cuanto a la cantidad de PFPH, que se depositó sobre la fibra, cuando ésta se encontró completamente saturada, se reconoce que esta cantidad no fue determinada en unidades másicas (g); sin embargo, se tiene un registro de la cantidad de PFPH en términos de área (cuentas), observada en los cromatogramas obtenidos de los análisis. Esta área fue de 1.085×10^7 cuentas con un CV = 2.4% (n = 2). Con este registro y manteniendo aproximadamente la misma cantidad de PFPH depositada sobre la fibra, se buscó disminuir el tiempo de exposición de la fibra aumentando la concentración de la solución acuosa de PFPH. Este propósito se consiguió aumentando la concentración de la solución

de PFPH de 0.1 a 0.8 mM, y los respectivos resultados se presentan a continuación (ver **Figura 19**).

Figura 19. Exposición de la fibra de PDMS-DVB a una solución acuosa de PFPH de 0.8 mM.



Como se muestra en la **Figura 19**, con sólo cuatro minutos de exposición de la fibra de PDMS-DVB, la cantidad de PFPH, que se deposita en ella (1.18×10^7 cuentas, %CV = 3.0%), es aproximadamente equivalente a la que se deposita durante 60 min de exposición (1.085×10^7 cuentas, CV de 2.4 %), pero a partir de la solución de PFPH 0.1 mM. Modificar la concentración de la solución de PFPH de 0.1 a 0.8 mM, ofrece la ventaja de reducir el tiempo de saturación de la fibra con PFPH y, por tanto, del método de análisis.

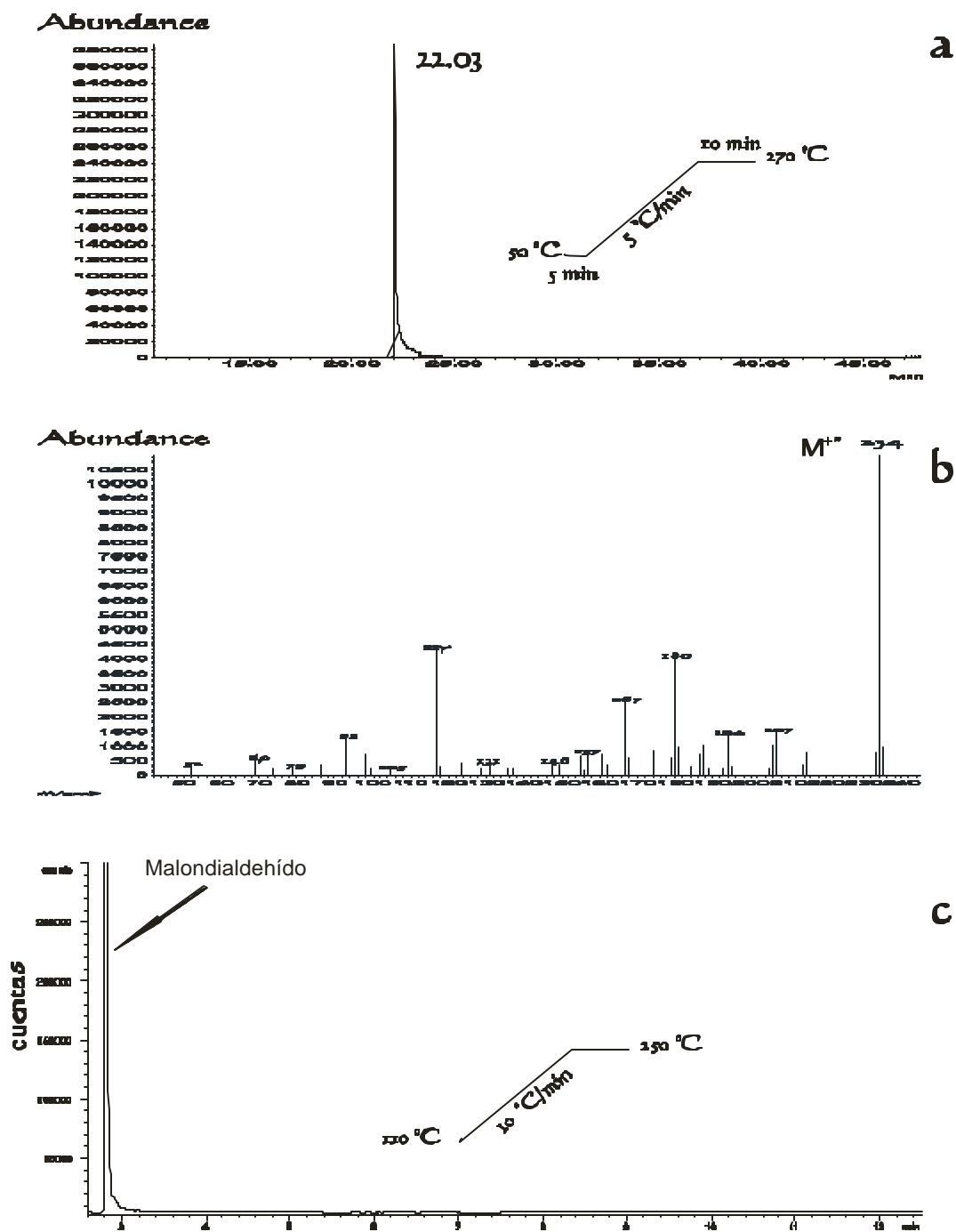
Cuatro minutos de exposición de la fibra de PDMS-DVB y la concentración de la solución de PFPH de 0.8 mM, fueron dos parámetros escogidos para el desarrollo del método, que se fijaron para las pruebas que siguen.

4.3.4.3 Síntesis del derivado del malondialdehído. Para la determinación del malondialdehído en las muestras de aceite, primero, se sintetizó su derivado hidrazónico de acuerdo con un procedimiento reportado [43] (ver capítulo 3 de la metodología). La muestra obtenida en la síntesis del malondialdehído se analizó por cromatografía de gases-espectrometría de masas (ver **Figura 20**). El rendimiento de la reacción fue del 60% (se recogieron 2.0 g); el nivel de pureza del derivado fue alto, a juzgar por la presencia del único pico en el cromatograma (**Figura 20**).

El espectro de masas presente en la **Figura 20 (b)** registra un pico en m/z 234 (pico de base), que puede ser asignado a la masa del ión molecular de la pentafluorofenilpirazol (derivado hidrazónico del malondialdehído). Si se asigna el pico base al ión molecular, los siguientes picos presentes en el espectro de masas pueden ser interpretados como fragmentos, que provienen del derivado hidrazónico del malondialdehído, formados a través de las diferentes reacciones de fragmentación probables en la espectrometría de masas (con impacto de electrones). Con base en lo anterior, se propuso esquema de fragmentación para el derivado, que sustenta la presencia de los picos representativos del espectro. De esta manera, se evaluó la identidad del compuesto sintetizado. En la **Figura 21** se presenta un esquema correspondiente a la posible ruta de fragmentación.

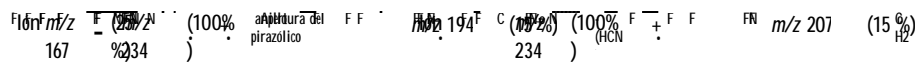
En el esquema se plantea, primero, la formación del ión molecular (M^+ , m/z 234), que es el pico de base en el espectro y, posteriormente, su apertura y eliminación de una molécula de HCN, con formación del fragmento F_1 en m/z 207 y abundancia del 15%. De este mismo anillo abierto (m/z 234), también se forma un catión F_2 (m/z 194, abundancia del 15%) a través de la formación de un radical $\cdot\text{CH}_2\text{CN}$, y el catión F_3 , en m/z 167 con abundancia del 25 %, se obtiene a partir del ión molecular, por la eliminación del radical pirazólico.

Figura 20. Análisis del derivado del malondialdehído. **a.** Cromatograma típico del derivado del malondialdehído (columna DB - 5MS de 50 m, MSD). **b.** Espectro de masas del único pico presente en el cromatograma. **c.** Cromatograma típico del derivado del malondialdehído (columna HP-5 de 30 m, ECD).



Es necesario aclarar, que la identificación del derivado del malondialdehído es tentativa; sin embargo, es de anotar, que el ión molecular y los fragmentos correspondientes a los picos en m/z 194 y 167 coinciden con los reportados en el trabajo base de esta síntesis [43] para el derivado en cuestión; y no está de más recordar, que el procedimiento seguido en este trabajo, para la síntesis y purificación del derivado, fue tomado precisamente del trabajo de este autor. Aunque, como ya se mencionó, la identificación fue tentativa, en lo que sigue de este trabajo se supuso que evidentemente la fracción obtenida era el derivado hidrazónico del malondialdehído y, en consecuencia, fue usado como sustancia de referencia para identificar el malondialdehído en las muestras de aceites. El cromatograma registrado para este derivado por GC-ECD, por el mismo método cromatográfico por el que se analizaron las muestras de aceite, se presenta en la **Figura 20(C)**.

Figura 21. Esquema de fragmentación de la pentafluorofenilpirazol (PFPH-MDA).



+

4.3.4.4 Condiciones de derivación de los aldehídos. Para la selección de las condiciones de derivación de los aldehídos se realizaron las siguientes curvas de calibración: Primero, una curva de concentración de aldehídos en aceite (de 0.1, 0.5 y 1.0 μM , y el blanco), *versus*, respuesta del detector; con un tiempo de exposición de la fibra (saturada previamente con PFPH), al espacio de cabeza de la solución oleosa de aldehídos, de 40 minutos (ver **Figura 22**). Una segunda curva en el intervalo de concentraciones de 0.1 a 5.0 μM (ver **Figura 23**). Y una tercera curva, de tiempo de exposición de la fibra de PDMS/DVB (saturada con PFPH) al espacio de cabeza, de un aceite calentado 15 horas a $190 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, *versus*, respuesta del detector de captura de electrones (ver **Figura 24**).

Figura 22. Derivatización con PFPH de los aldehídos saturados removidos del espacio de cabeza de soluciones oleosas de concentraciones entre 0.1 y 1.0 μM (matriz oleosa, ver **Tabla 7**). Tiempo de derivación 40 min.

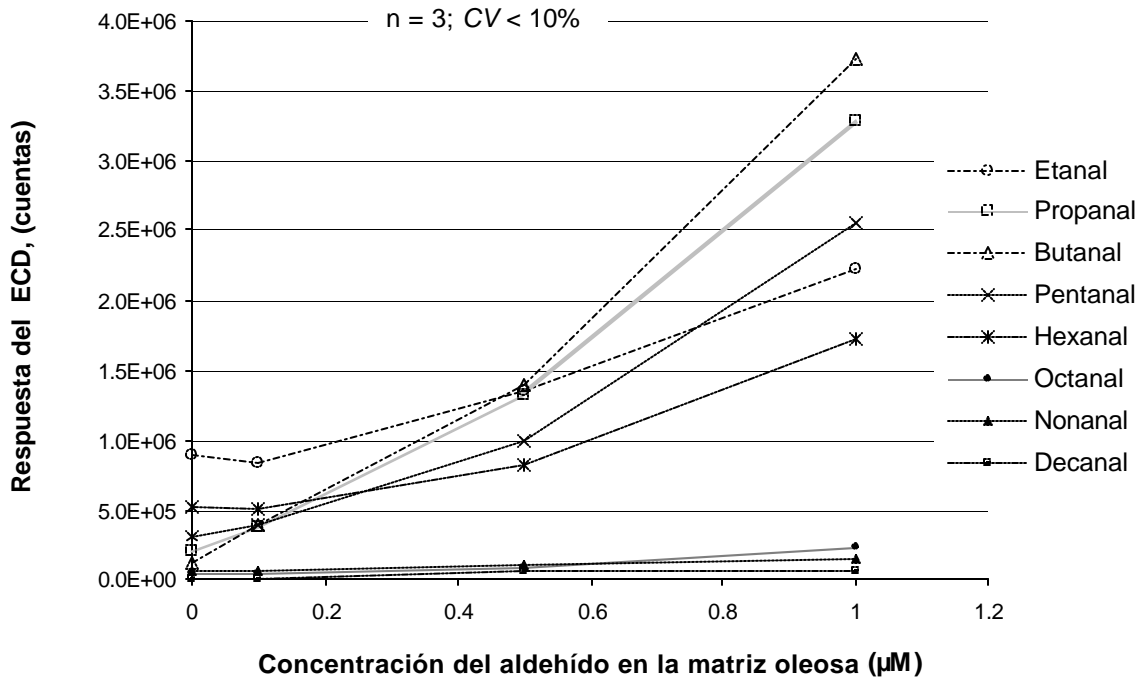


Figura 23. Derivatización con PFPH de los aldehídos saturados removidos del espacio de cabeza de soluciones oleosas de concentraciones entre 0.1 y 5.0 μM (matriz oleosa, ver **Tabla 7**). Tiempo de derivación 15 min.

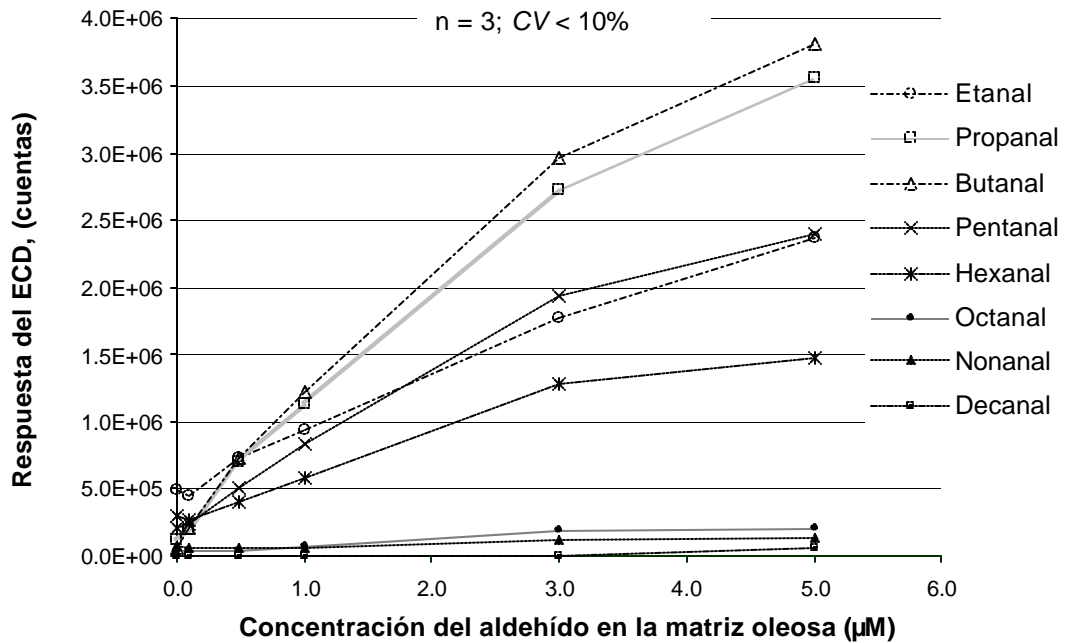
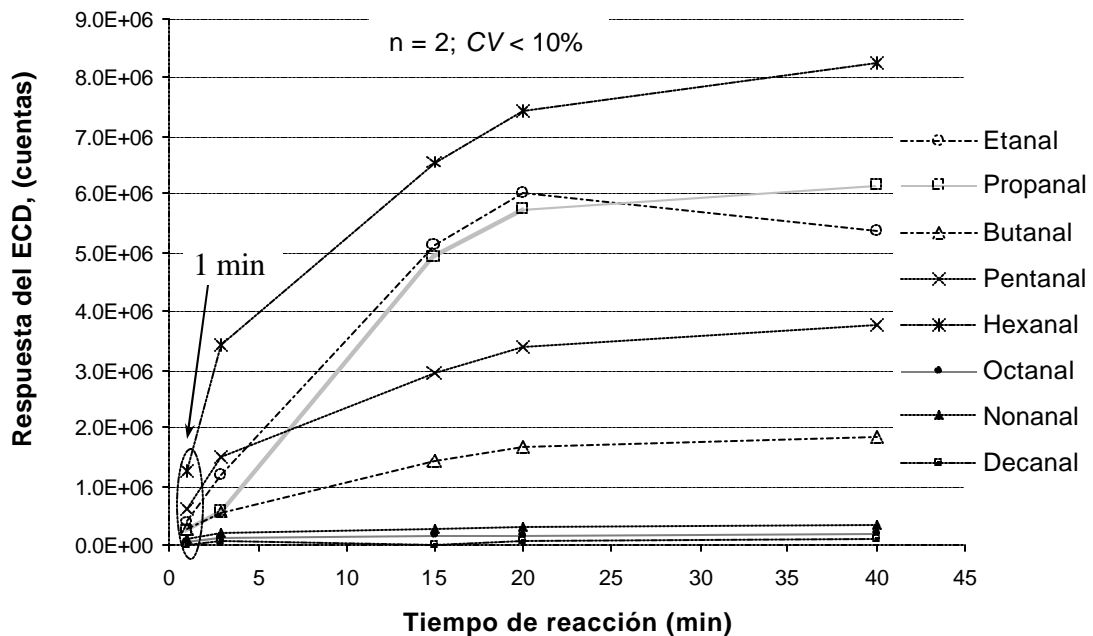


Figura 24. Derivatización con PFPH de los aldehídos saturados volátiles removidos del espacio de cabeza de un aceite calentado durante 15 horas a 190 ± 2 $^{\circ}\text{C}$ (matriz oleosa, ver **Tabla 7**). El tiempo de derivación varió entre 1 y 40 min.



En la segunda curva de calibración (ver **Figura 23**) se mejora la correlación entre la variables estudiadas, lo que permite registrar una determinada tendencia en los resultados. Lo anterior no sucedía con la primera curva (ver **Figura 22**). Sin embargo, ésto no fue suficiente, por lo que se determinó realizar la tercera curva de calibración.

Como ya se mencionó en la parte experimental, el procedimiento para todas las pruebas, inicialmente, consistió en saturar la fibra con el agente derivatizante por exposición de ésta al espacio de cabeza de una solución 0.8 mM de PFPH (2 mL) durante 4 min. Luego de saturar la fibra, ésta se expuso al espacio de cabeza de 2 mL de la solución oleosa (matriz oleosa, ver **Tabla 7**) de aldehídos durante diferentes tiempos. Los tiempos dependían de la curva que se estuviera realizando. Los análisis de las tres pruebas se hicieron por duplicado.

Tabla 7. Cantidad relativa (%) de metilésteres de ácidos grasos en aceite vegetales de la marca Premier. Aceite usado como matriz para la elaboración de la curva de calibración.

Ácido graso	%	%CV
Mirístico (C14:0)	0.1	3.8
Pentadecanoico (C15:0)	0.1	4.0
Palmítico (C16:0)	2.1	3.8
Palmitoleico (C16:1)	0.1	3.1
Heptadecanoico (C17:0)	0.1	6.8
<i>cis</i> -10-Heptadecenoico (C17:1)	0.1	3.9
Estearico (C18:0)	2.0	5.8
Oleico (C18:1)	18.5	2.8
Linoleico (C18:2)	75.5	1.0
Linolénico (C18:3)	1.0	1.2
Araquídico (C20:0)	0.2	6.0
Eicosenoico (C20:1)	0.2	3.9
Behénico (C22:0)	0.4	5.6

En la selección de las condiciones de derivación se tuvieron en cuenta tres parámetros, a saber: tiempo de reacción, éste es, tiempo de exposición de la fibra saturada con PFPH al espacio de cabeza de la solución oleosa que contiene los aldehídos; sensibilidad del detector y linealidad del intervalo de concentraciones en las que se pretende realizar la curva de calibración. Con la primera prueba realizada para la selección propuesta, se exploró un intervalo de concentraciones entre 0.1 y 1.0 mM, con un tiempo de reacción de 40 min (Ver **Figura 22**). Los resultados muestran linealidad pobre, aún para sólo cuatro concentraciones, incluido el blanco.

En la segunda prueba se buscó ampliar el intervalo de concentraciones a explorar, con el objeto de encontrar un intervalo con cierta linealidad. Esto se sondeó con una disminución del tiempo de reacción a 15 min. Es necesario resaltar, que con la disminución del tiempo de reacción se reduce la sensibilidad del método, ya que la cantidad de aldehídos que reaccionan es menor y, por tanto, la respuesta del detector a los derivados. A pesar de lo anterior, con la disminución del tiempo de reacción es posible ampliar el intervalo de linealidad del método. En la **Figura 23** se presentan los resultados de esta segunda prueba. Allí se observa, que el intervalo de concentraciones exploradas fue ampliado desde 0.1 mM hasta 5.0 mM. Esta prueba muestra, que para todos los aldehídos, su respectiva reacción con la PFPH tiende rápidamente hacia el equilibrio, cuando la concentración de la solución oleosa se incrementa.

Si bien es cierto, que con un tiempo de reacción de 15 minutos, y para el intervalo de concentraciones de esta segunda prueba, no se encontró linealidad alguna (ver **Figura 23**), esta prueba sí permite ver la posibilidad de seguir disminuyendo el tiempo de reacción, para ampliar aún más el intervalo de concentraciones, y así mejorar las posibilidades de encontrar el rango de concentraciones con la linealidad requerida para el método que se propone este trabajo. Antes de pasar al análisis de la tercera prueba, es importante señalar, que las dos pruebas

anteriores dejan ver fácilmente la diferencia en propiedades como volatilidad y/o afinidad (por la PFPH) de cada uno de los aldehídos derivados. Nótese en las **Figuras 22 y 23** la diferencia marcada en la respuesta del detector entre los aldehídos C₂-C₆, y C₈ y C₉. El decanal, en algunos casos, no se detectó.

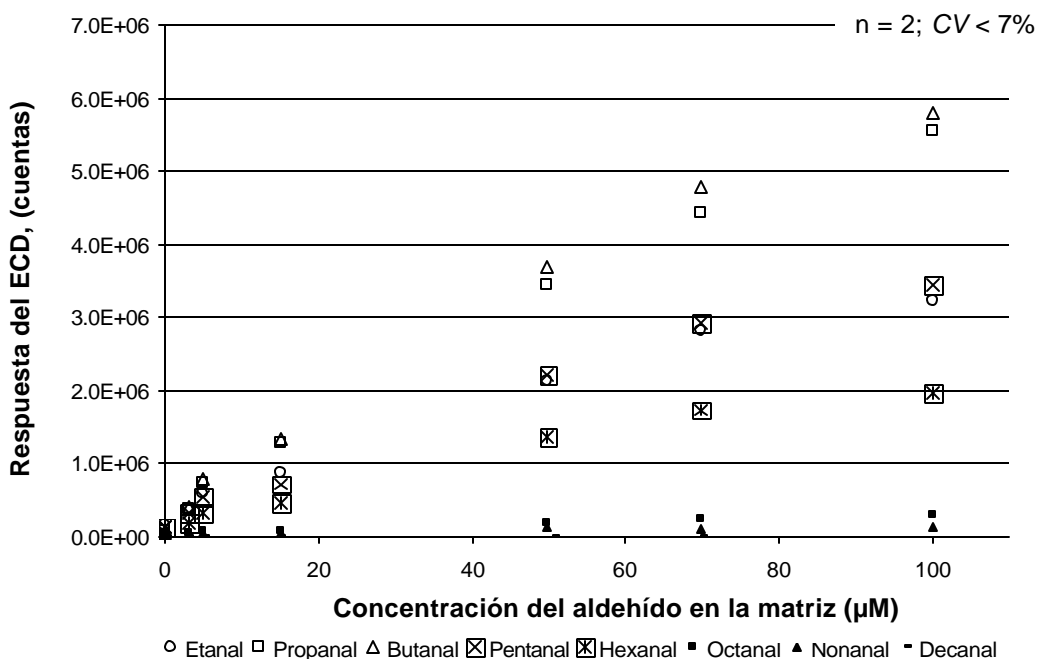
La tercera prueba consistió en calentar un aceite comestible (Ver composición del aceite en la **Tabla 7**) durante 15 horas seguidas a 190 ± 2 °C y, luego, determinar el contenido de aldehídos en forma de sus derivados de PFPH. La diferencia con las dos pruebas anteriores consistió en que ésta mantuvo la concentración de la solución (por cierto, desconocida) constante y, lo que se varió, fue el tiempo de derivación en un rango amplio, de 1 a 40 minutos de reacción (ver **Figura 24**). Lo anterior permitió observar que a los 40 min de derivación, prácticamente todos los aldehídos analizados (en el aceite calentado) ya han alcanzado el equilibrio de reacción; a diferencia de lo que sucedió en la primera prueba al mismo tiempo de reacción (ver **Figura 22**).

En la **Figura 24**, además, se puede observar, cuando se disminuye el tiempo de derivación, que la señal se aproxima al nivel mínimo de detección del sistema. Sin embargo, éste es un parámetro que tiene que “sacrificarse” considerablemente a costa de ampliar el rango dinámico lineal del método, a un tiempo fijo. Por ejemplo, en la prueba dos, ni siquiera en el intervalo explorado (0.1 a 0.5 mM), pequeño por cierto, se observó buena linealidad, a pesar de tener un tiempo de derivación de los aldehídos de 15 min.

Siguiendo la tendencia de ir disminuyendo el tiempo de derivación para aumentar el rango de concentraciones, en el cual se observa linealidad, se optó por evaluar lo que sucedía cuando el tiempo de derivación se disminuía hasta tan solo un minuto. Es cierto, que se sacrifica la sensibilidad, pero se gana un poco en la reducción del tiempo de análisis.

4.3.4.5 Curva de calibración. Para la elaboración de la curva de calibración se prepararon soluciones oleosas (matriz oleosa, ver **Tabla 7**) de aldehídos de 3, 5, 15, 50, 70 y 100 μM y un blanco. Como ya se mencionó anteriormente, el tiempo de derivación fue de 1 minuto y el tiempo de absorción de la fibra con PFPH se fijó en 4 min. Los resultados obtenidos se presentan en la **Figura 25**.

Figura 25. Derivatización con PFPH de los aldehídos saturados removidos del espacio de cabeza de soluciones oleosas de concentraciones entre 3.0 y 100 μM (matriz oleosa, ver **Tabla 7**). Tiempo de derivación 1 min.



Como se puede observar en la **Figura 25**, para el intervalo explorado aún se reconoce una tendencia a alcanzar el equilibrio de la reacción; pues, los resultados se ajustan más a una función cuadrática que a una función lineal (ver **Tabla 8**). Sin embargo, si se reduce el intervalo de concentraciones, excluyendo el punto en la gráfica que corresponde a la concentración de 100 μM , los resultados del nuevo intervalo de concentraciones (de 3.0 a 70.0 μM , incluido el blanco de la matriz) tienen una correlación lineal tan alta, que puede usarse

como curva de calibración y, que de hecho se usó (Ver **Anexo 2**). Claro está, el nonanal y el decanal no se pudieron cuantificar en los aceites estudiados; el primero, por la baja correlación obtenida, y el segundo, porque no se detectó a las condiciones establecidas en el método.

Tabla 8. Coeficientes de correlación entre la concentración de las soluciones oleosas usadas para la calibración y, la respectiva respuesta del ECD, a cada uno de los aldehídos derivados.

Derivado	Correlación lineal (r^2), 0 - 100 μM	Correlación cuadrática (r^2), 0 - 100 μM	Correlación lineal (r^2), 0 - 70 μM
Etanal	0,9757	0,9967	0,9953
Propanal	0,9869	0,9984	0,9931
Butanal	0,9820	0,9980	0,9935
Pentanal	0,9811	0,9958	0,9960
Hexanal	0,9724	0,9954	0,9956
Octanal	0,9799	0,9914	0,9914
Nonanal	0,9079	0,9164	0,8506
Decanal	ND	ND	ND

ND: No detectado

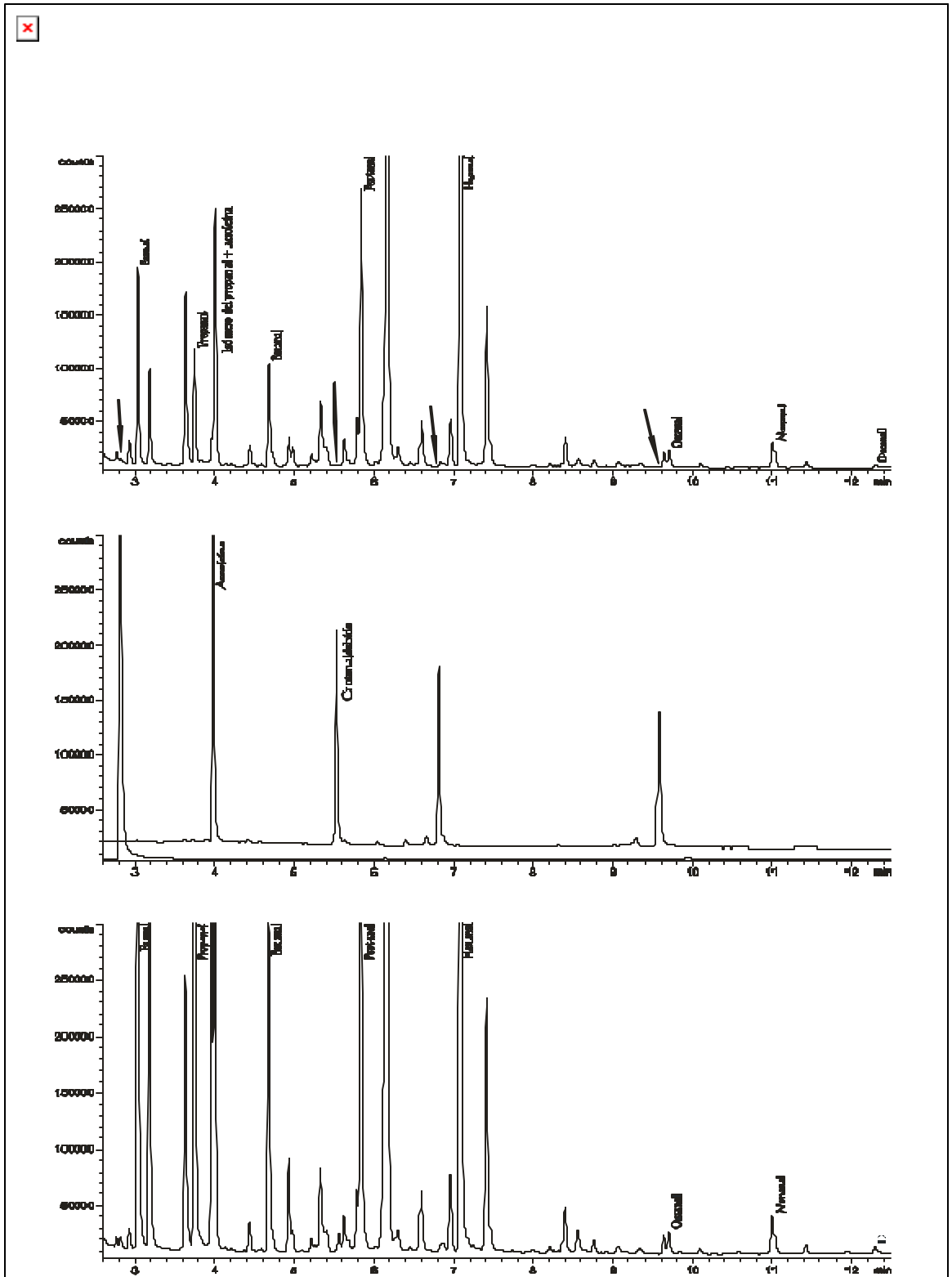
La curva de calibración, que se presenta en el **Anexo 1**, se ajustó al origen para la cuantificación. Lo anterior debido a que la matriz utilizada fue un aceite comestible que, aunque fuera sin usar, tenía aldehídos. Este último hecho es revelante, ya que indica, que los aceites que se ofrecen en el mercado, inician el proceso de degradación lipídica antes de llegar al consumidor final.

En cuanto a los aldehídos insaturados y, en específico, a la acroleína, el crotonaldehído, *trans*-2-pentenal, *trans*-2-heptenal y el malondialdehído, se anota, que estos no fueron detectados, en aceites calentados, bajo las condiciones a las cuales se determinaron los aldehídos saturados. En el cromatograma de la **Figura**

26 (a), que es de un aceite calentado durante 15 horas, se observa, si se compara con el cromatograma de la **Figura 26 (a)**, la ausencia de los aldehídos insaturados como malondialdehído, crotonaldehído y *trans*-2-heptenal. Y con respecto a la acroleína y el *trans*-2-pentenal, en los mismos cromatogramas anteriores, se duda de su presencia. La duda con respecto a la acroleína reside en que su tiempo de retención coincide con el del isómero de menor área del derivado PFPH de propanal, mientras que con el *trans*-2-pentenal, la duda radica en la señal registrada baja.

Con el objeto de explorar sobre la posibilidad de detectar en aceites calentados los aldehídos insaturados por el método que se ha desarrollado, se procedió a analizar un aceite sometido a un calentamiento prolongado (24 horas). Este aceite fue sometido al siguiente tratamiento térmico: durante cuatro días consecutivos, el aceite se calentó durante seis horas seguidas, en un recipiente abierto, a una temperatura de 190 ± 2 °C. Después de terminado cada ciclo, el aceite se dejó enfriar a temperatura ambiente. Al final del último ciclo, el aceite se tapó herméticamente bajo atmósfera de nitrógeno y se guardó a 4 °C hasta el momento en que fue analizado su contenido de aldehídos. En la **Figura 26 (a)** se muestra el cromatograma obtenido para esta muestra de aceite. En éste se reconoce claramente el pico correspondiente al malondialdehído, a juzgar por la coincidencia del tiempo de retención con el del patrón (ver **Figura 26 (b)**) y porque se incrementó su intensidad con respecto a la registrada en el cromatograma de la **Figura 26 (a)**.

En lo que respecta al crotonaldehído, el *trans*-2-pentenal y el *trans*-2-heptenal, los resultados hasta ahora presentados, incluido el cromatograma de la **Figura 26 (b)**, no dejan ninguna certeza con respecto a las posibilidades de analizarlos por el método desarrollado. Lo anterior, debido a que los tiempos de retención de sus respectivos patrones no coinciden (error < 1%), con ninguno de los picos registrados en los cromatogramas de los aldehídos presentes en los aceites estudiadas.



Por los motivos expresados, en lo referente a los aldehídos insaturados, y por el hecho de que los períodos de calentamiento de los aceites a analizar en este trabajo no sobrepasaron las 9 horas, lo que redujo aún más las posibilidades de registrarlos, se decidió inicialmente no tener en cuenta estos aldehídos, por lo que, los únicos aldehídos cuantificados fueron: etanal, propanal, butanal, pentanal, hexanal y octanal.

4.3.4.6 Determinación del NMD y NMC. El nivel mínimo de detección (NMD) se establece como la cantidad de analito que produzca una señal 5 veces mayor que el ruido del detector. El nivel mínimo de cuantificación equivale al doble del de detección. En la **Tabla 9** se presentan los valores de NMD y NMC, para cada uno de las hidrazonas sintetizadas.

Tabla 9. NMD y NMC, determinados por CG-ECD, de los derivados hidrazónicos de los aldehídos estudiados.

Aldehído	NMD, μM (S/N = 5)	NMC, μM (S/N = 10)
Etanal	0,04	0,08
Propanal	0,04	0,08
Butanal	0,04	0,08
Pentanal	0,07	0,14
Hexanal	0,11	0,27
Octanal	0,60	1,20

4.3.4.7 Determinación de los aldehídos volátiles en las muestras de aceite.

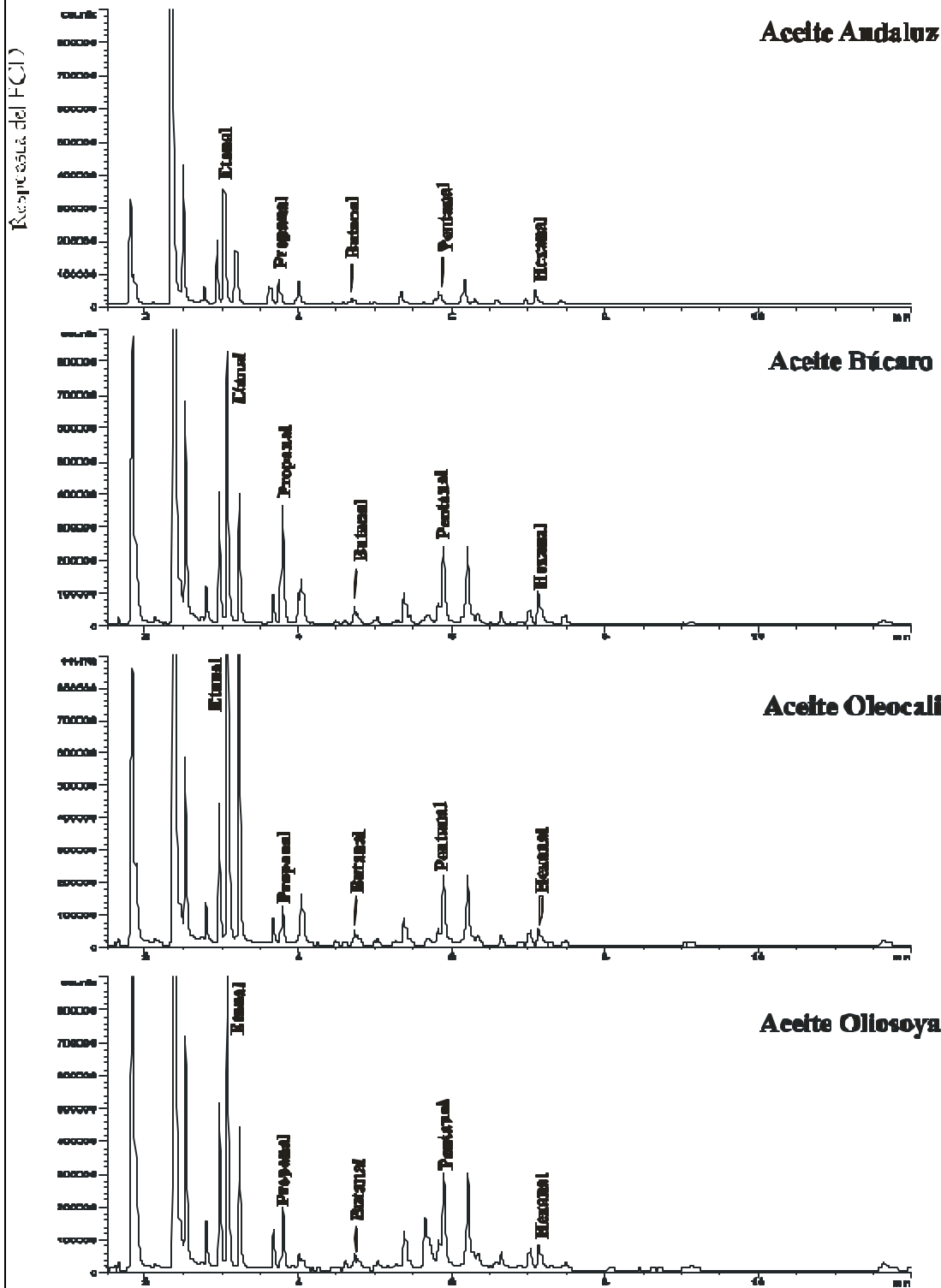
La determinación de los aldehídos volátiles presentes en las muestras de aceite se hizo por el método descrito en la primera parte del trabajo, tal como se indica para la realización de la curva de calibración. En la **Figura 27**, se presentan los cromatogramas típicos de cada aceite.

Los resultados de la determinación de etanal, propanal, butanal, pentanal, hexanal y octanal en los aceites, se presentan en la **Figura 27**. Estos resultados muestran, que los aceites, que se ofrecen en el mercado como “nuevos” y, en particular, los analizados, contienen concentraciones de cada uno de los aldehídos analizados de hasta 30 μM , y en el caso del etanal hasta 140 μM ; lo que supone, que el proceso de oxidación de los aceites inicia antes de que el producto llegue al consumidor.

Los aldehídos, que se encontraron en mayor concentración en los aceites sin usar, fueron: etanal, hexanal, pentanal y propanal; el butanal sólo se registró en los aceites Oleocali y Oliosoya (en concentraciones menores de 10 μM), mientras que el octanal no se registró en ninguno de los cuatro aceites. Es de resaltar, que el aldehído que se encontró en mayor concentración en los cuatro aceites analizados, sin calentamiento, fue el etanal. Sobresale el aceite Oleocali, por su concentración de etanal de 131.9 μM , muy por encima de los demás aceites.

Lo que sucede con cada aldehído presente en los aceites después de su tratamiento térmico (de 3, 6 y 9 horas a 190 °C), se discute a continuación. Por ejemplo, el etanal, que proviene de la degradación oxidativa del 13-hidroperóxido del ácido linoleico o sus respectivos ésteres [16], disminuye su concentración con respecto al valor inicial, cuando el aceite se calienta durante tres horas. Luego, la concentración de etanal vuelve a incrementarse levemente (después de seis horas de calentamiento).

Figura 27. Cromatogramas típicos de aldehídos, presentes en el espacio de cabeza, de los aceites vegetales sin calentar (blancos).



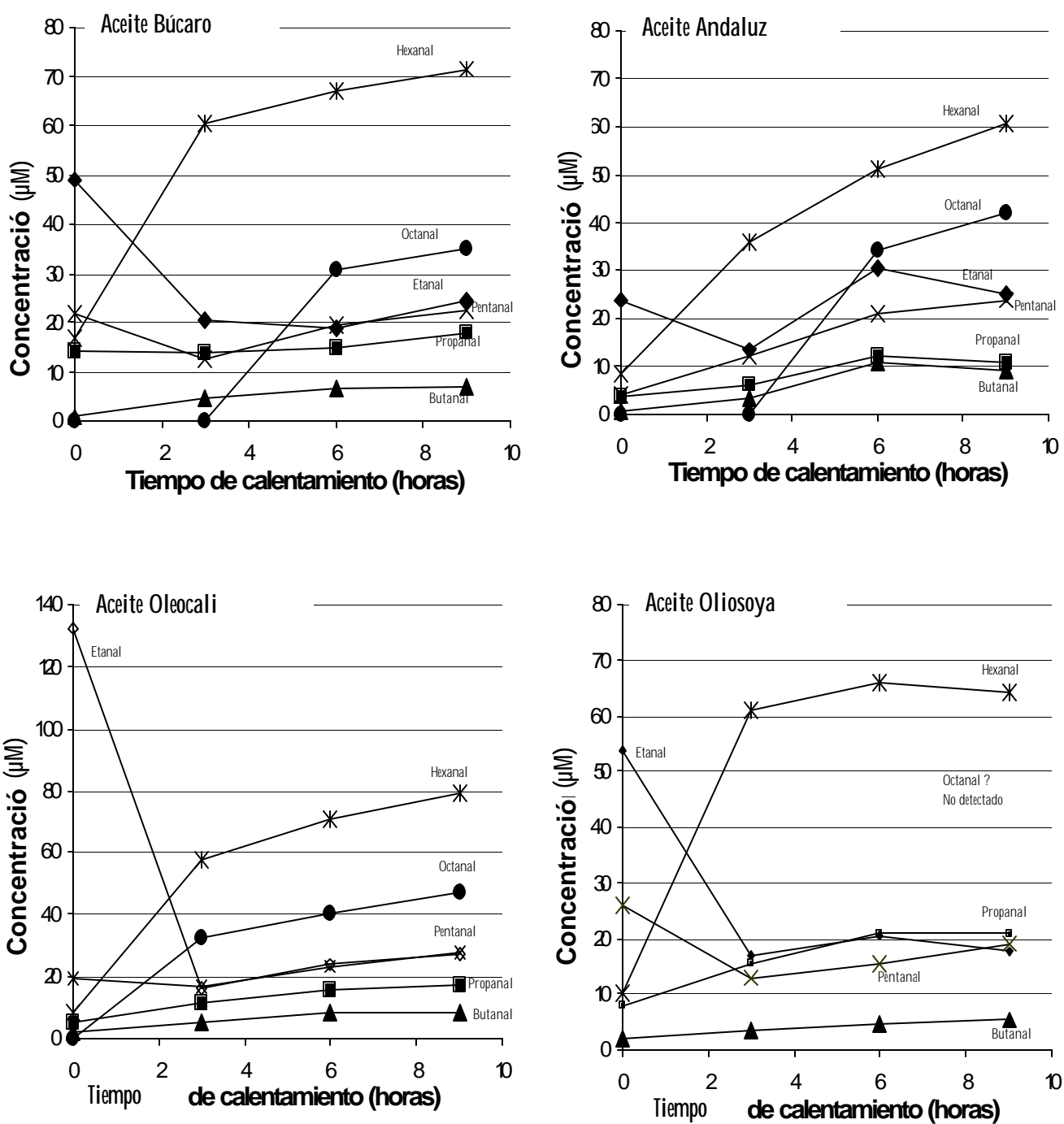
El hecho, que la concentración de etanal sea superior en el aceite sin calentar, que después de calentado, puede ser explicado como resultado de la oxidación del aceite (que produce etanal) y/o por contaminación, por contacto con el recipiente en el que viene empacado el aceite [hecho con base en poli(etilentereftalato)]. Se supone, que una vez el aceite se destapa y se empieza a calentar, el etanal, por ser bastante volátil se pierde rápidamente, disminuyéndose su concentración, así como se observa en los resultados (**Figura 28**). Posteriormente, la concentración de etanal vuelve a incrementarse por efecto del avance de la oxidación en el aceite, aparentemente dirigiéndose a un límite superior (ca. entre 20 y 30 μM), que puede ser la concentración de saturación del etanal en el aceite, en las condiciones experimentales del trabajo.

En cuanto a la evolución de la concentración del propanal (proveniente de la trilinoleína) y del butanal (proveniente tanto de la trilinoleína como del metil linolenato), éstos prácticamente tienen el mismo comportamiento, su concentración se incrementa hasta un límite aparente, que en el caso del propanal no es superior a 20 μM , y en el del butanal a 10 μM (**Figura 28**).

Por su parte, el pentanal, que proviene del ácido linoleico [16], tiene un comportamiento similar al observado con el etanal, esto es, su concentración en el aceite sin calentar, es superior a la registrada después de tres horas de calentamiento. A las seis y nueve horas, la concentración del pentanal se incrementa levemente con respecto a la registrada a las tres horas de calentamiento.

El aldehído que se encontró en mayor concentración en los cuatro aceites fue el hexanal (ca. 80 μM). El incremento de su concentración en los aceites, es muy pronunciado, si se compara con el incremento de la concentración de los otros aldehídos. Sin embargo, la concentración del hexanal en el aceite, a medida que se prolonga el período de calentamiento, sigue una tendencia semejante a la de los otros aldehídos.

Figura 28. Evolución de la concentración de aldehídos volátiles, en aceites vegetales de consumo humano, después de varios períodos de calentamiento, a $190 \pm 2^\circ\text{C}$.



Por otra parte, cobra importancia comparar la concentración del hexanal con la del ácido linoleico, que su precursor. A continuación, en la **Tabla 10**, se presenta esta comparación, para los cuatro aceites estudiados.

Tabla 10. Relación entre el contenido del hexanal¹ y del ácido linoleico² estudiados.

Aceite	Ácido linoleico, % p/p	Hexanal, μM
Oliosoya	36.7	64.2
Búcaro	14.4	71.4
Oleocali	11.0	79.4
Andaluz	7.2	60.8

¹ En los aceites calentados durante 9 horas; ² Ácido linoleico medido en forma de sus metiléster, en los aceites sin calentar.

Como se puede observar en la **Tabla 10**, no sucede exactamente, como podría esperarse, que a menor porcentaje del ácido linoleico, se observa una concentración más baja del hexanal en el aceite calentado. Esto puede explicarse considerando, primero, que el hexanal producido, por efecto de la oxidación del ácido linoleico, se difunde hacia la atmósfera; y sólo queda disuelta en la matriz oleosa, cierta cantidad, la cual se mide a través de la determinación que se hace en el espacio de cabeza. Y segundo, por el contenido de compuestos antioxidantes presentes en aceites comerciales, de los cuales no se tiene información sobre su cantidad.

Por otra parte, el hecho que el hexanal se encuentre en el aceite en concentraciones superiores a la de los demás aldehídos, puede ser posible por dos razones, a saber:

- La facilidad de oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados, y en especial, del ácido linoleico, que es la fuente del hexanal. Por ejemplo, la relación de velocidad de oxidación entre los ácidos esteárico y oleico (a 20 °C) es de 1:100; entre el ácido esteárico y el linoleico de 1:1200, y entre el ácido esteárico y el linolénico 1:2500 [44]. A lo anterior se le suma, que las concentraciones del ácido linolénico están muy por debajo de las del ácido linoleico (ver **Tabla 6**); además, en condiciones ácidas (ver **Figura 16**) la oxidación del ácido linoleico se hace más selectiva hacia la producción de hexanal [16].
- La segunda razón se adjudica a la mayor afinidad del hexanal por la fase hidrofóbica, en comparación con los otros aldehídos volátiles de menor número de carbonos.

En últimas, la mayor concentración del hexanal en los aceites puede ser debido a una combinación de los dos factores anteriormente enumerados: la facilidad y selectividad de la oxidación del ácido linoleico y la solubilidad del hexanal en el aceite.

El octanal fue el segundo aldehído que se encontró en concentraciones altas. Éste proviene del ácido oleico y/o linoleico [44]. En los aceites Búcaro y Andaluz, el octanal sólo se registró a las seis horas de calentamiento, mientras que, en el aceite Oliosoya, no se detectó en el espacio de cabeza. Esto último puede ser debido a que, la concentración relativa del ácido oleico (principal precursor del octanal) en el aceite Oliosoya es baja, en comparación con los demás aceites (ver **Tabla 6**). Además, porque la más alta concentración de ácido linoleico en el aceite Oleocali puede ofrecer, eventualmente, un aparente efecto protector sobre el ácido oleico, ya que el ácido linoleico se oxida más fácilmente y se “sacrifica” primero.

En lo que tiene que ver con la posibilidad de usar el contenido de cada uno de los aldehídos en el *headspace* del aceite como indicadores del deterioro del aceite, se calcularon los coeficientes de correlación (r^2) entre la concentración registrada de cada uno de los aldehídos y el tiempo de calentamiento del aceite. Claro está, suponiendo que, a las condiciones experimentales probadas, la variable determinante en la oxidación de los lípidos del aceite, es el tiempo de calentamiento (a temperatura constante). Los coeficientes relacionados se presentan en la **Tabla 11**.

En la **Tabla 11**, se puede observar, que la varianza en la concentración de cada aldehído, influenciada por la extensión en el tiempo de calentamiento, es muy dispersa. Por ejemplo, en el aceite Andaluz el r^2 pasa de 0.1529 para el etanal a un $r^2 = 0.9605$ para el pentanal. Situación semejante se presenta para los demás aceites.

A pesar de la dispersión de los resultados, señalada en el párrafo anterior, es necesario resaltar que, para la mayoría de los aldehídos presentes en los cuatro aceites, la variación de su concentración puede ser atribuída al cambio del período de calentamiento (hasta en un 80% y más). Se destacan, el butanal en el aceite Oliosoya ($r^2 = 0.9877$), el pentanal en el aceite Andaluz ($r^2 = 0.9605$) y el propanal en el aceite Oleocali ($r^2 = 0.9547$) (ver **Tabla 11**). Sin embargo, el hecho que el butanal tenga una correlación lineal relativamente alta, solamente para el aceite Oliosoya (y no para los demás aceites), deja dudas con respecto a su posible uso como indicador del progreso (avance) de la oxidación lipídica. La duda radica en la falta de evidencias sobre la existencia de una tendencia general de la correlación (señalada atrás) en los otros aceites estudiados (ver **Tabla 11**); lo mismo se puede afirmar sobre el pentanal y el propanal.

Tabla 11. Coeficientes de correlación (r^2) lineal y cuadrático entre las variables estudiadas, concentración del aldehído y tiempo de calentamiento, para los aceites Andaluz, Búcaro, Oleocali y Oliosoya.

Aldehído	Correlación lineal (r^2) C=at+b				Correlación cuadrática (r^2) C=at ² +bt+c			
	Aceite				Aceite			
	Andaluz	Búcaro	Oleocali	Oliosoya	Andaluz	Búcaro	Oleocali	Oliosoya
Etanal	0.1529	0.4725	0.5226	0.5798	0.1986	0.9693	0.9109	0.884
Propanal	0.8055	0.6351	0.9547	0.8715	0.8784	0.9906	0.9995	0.9966
Butanal	0.7905	0.9082	0.9151	0.9877	0.86	1	0.9776	0.9994
Pentanal	0.9605	0.0848	0.7299	0.1736	0.9907	0.6866	0.9109	0.8876
Hexanal	0.9467	0.7626	0.8482	0.6473	0.9986	0.9668	0.9827	0.9656
Octanal	0.8646	0.8454	0.8559	0.0667	0.8744	0.8495	0.9789	

Nota: La temperatura de calentamiento fue 190 ± 2 °C.

Si estas mismas variables (concentración de aldehídos y tiempo de calentamiento) se intentan ajustar a un comportamiento polinomial (de orden 2), y se calculan sus coeficientes de correlación (r^2), nos encontramos con que éstos se incrementan considerablemente (ver **Tabla 11**). Esto refleja que existe cierta tendencia polinomial, como se observa en la **Tabla 11**, de la concentración de algunos aldehídos en el aceite, cuando el tiempo de calentamiento se incrementa.

En conjunto, el aumento de r^2 en la correlación cuadrática indica, cuando la concavidad es positiva, que la concentración del aldehído en el aceite tiende a disminuir su incremento con el tiempo de calentamiento, cuando los aceites se han calentado más de 6 horas a 190 ± 2 °C. Este hecho es muy importante, pues, podría evaluarse la posibilidad de fijarse una concentración, de algunos de los aldehídos analizados, a partir de la cual se considere que el aceite ya tiene cierto grado de deterioro; y puede usarse sobre todo como criterio de calidad de aceites calentados en la industria.

4.4 COMPARACIÓN DE MÉTODOS

Esta comparación se realizó para evaluar si la información obtenida en la determinación de aldehídos tenía relación alguna con los datos ofrecidos por los otros métodos usados en este trabajo, como son: determinación de FAME's (en especial, la variación de la composición de los ácidos grasos insaturados), índices de acidez y yodo. Para comparar estos métodos, se procedió a calcular los coeficientes de correlación entre sus resultados (ver **Tabla 12**).

De los resultados, que se presentan en la **Tabla 12**, se puede observar que no existe ninguna regularidad, en cuanto a los valores de r^2 , entre cantidad de aldehídos determinados y valores de otros parámetros medidos. Es decir, por ejemplo, compárese los valores de la correlación (r^2) entre el pentanal y el ácido oleico (C18:1); octanal y el ácido oleico (C18:1) y entre el octanal y el índice de yodo, para los cuatro aceites estudiados (ver **Tabla 12**). Obsérvese, que estos coeficientes (r^2) no presentan ninguna regularidad para los cuatro aceites. Este hecho se repite con las demás correlaciones calculadas e incluidas en la **Tabla 12**.

Un ejemplo similar se puede encontrar para el aceite Búcaro (ver **Tabla 12**). Obsérvese, que los coeficientes, con un subrayado simple, del aceite Búcaro son superiores a 0.9; mientras que los coeficientes igualmente subrayados en los otros aceites son muy dispersos. No se registran sospechas de alguna regularidad. Aparentemente lo anterior se puede explicar principalmente con base en las diferencias en la composición inicial de ácidos grasos en los aceites (ver **Tabla 6**), así como debido a la variación de sus propiedades a medida que aumenta el período de calentamiento, entre las cuales se pueden mencionar difusibilidad, solubilidad y viscosidad, entre otras; sin contar con la cantidad y la naturaleza de aditivos (básicamente, desconocidas), que fueron añadidos a los aceites.

Tabla 12. Coeficientes de correlación (r^2) entre los resultados obtenidos por diferentes métodos usados para la caracterización de los aceites comestibles. Los coeficientes resaltados fueron superiores a 0.9, en algunos de los cuatro aceites.

Aceite Andaluz:

	C18:1	C18:2	C18:3	Índices	
				acidez	yodo
Etanal	0.2914	0.2038	0.1034	0.1177	0.2833
Propanal	<u>0.8361</u>	<u>0.7001</u>	<u>0.5648</u>	0.4219	0.7050
Butanal	0.8291	0.6897	<u>0.5507</u>	0.4121	<u>0.6990</u>
Pentanal	0.9314*	0.8632	0.7840	0.6284	0.8337
Hexanal	0.8711	0.8240	<u>0.7764</u>	0.6054	<u>0.7706</u>
Octanal	0.9566*	0.8857	<u>0.7657</u>	<u>0.6997</u>	0.9231*

Aceite Búcaro:

	C18:1	C18:2	C18:3	Índices	
				acidez	yodo
Etanal	0.0067	0.2907	0.7473	0.3072	0.7035
Propanal	<u>0.9357</u>	<u>0.7983</u>	<u>0.3549</u>	0.7370	0.4241
Butanal	0.1634	0.7718	<u>0.9992</u>	0.7969	<u>0.9857</u>
Pentanal	0.6489*	0.1947	0.0018	0.2130	0.0038
Hexanal	0.0527	0.5919	<u>0.9418</u>	0.5970	<u>0.9295</u>
Octanal	0.4618*	0.8484	<u>0.7262</u>	<u>0.9159</u>	0.7129*

Aceite Oleocali:

	C18:1	C18:2	C18:3	Índices	
				acidez	yodo
Etanal	0.2667	0.5573	0.6590	0.4172	0.5584
Propanal	<u>0.6861</u>	<u>0.9475</u>	<u>0.9849</u>	0.8884	0.9644
Butanal	0.5769	0.8753	<u>0.9230</u>	0.8329	<u>0.9152</u>
Pentanal	0.7426*	0.6754	0.5944	0.7973	0.6944
Hexanal	0.5601	0.8611	<u>0.9296</u>	0.7574	<u>0.8712</u>
Octanal	0.5784*	0.8715	<u>0.9365</u>	<u>0.7688</u>	0.8792*

Aceite Oliosoya:

	C18:1	C18:2	C18:3	Índices	
				acidez	yodo
Etanal	0.1226	0.2984	0.3986	0.4627	0.3480
Propanal	<u>0.2516</u>	<u>0.5027</u>	<u>0.6247</u>	0.7946	0.5003
Butanal	0.5096	0.7589	<u>0.8556</u>	0.9485	<u>0.7546</u>
Pentanal	0.0080*	0.0147	0.0505	0.0938	0.0315
Hexanal	0.1145	0.3073	<u>0.4187</u>	0.5314	<u>0.3407</u>
Octanal	0.1211*	0.1017	<u>0.0823</u>	<u>0.1264</u>	0.0506*

En el caso del coeficiente de correlación entre los resultados de la determinación del hexanal y del ácido linoleico, se esperaría que fuese alta, precisamente porque el ácido linoleico es la fuente del hexanal; sorpresivamente ello no fue así (ver **Tabla 12**). Los coeficientes de correlación (r^2) que presentaron los cuatros aceites fueron los siguientes: Andaluz, $r^2 = 0.8240$; Búcaro, $r^2 = 0.5919$, Oleocali, $r^2 = 0.8611$ y Oliosoya, $r^2 = 0.3073$. Ejemplos similares, al del hexanal y del ácido linoleico, se pueden reseñar entre el octanal y el ácido oleico, pentanal y ácido linoleico y entre el propanal y el ácido linolénico (ver **Tabla 12**).

A manera de conclusión sobre la correlación de los resultados obtenidos por diferentes métodos de análisis de aceites, se puede afirmar, que bajo las condiciones experimentales, la evolución de la concentración de cada uno de los aldehídos en los aceites calentados, no se encuentra determinada por la concentración de ácidos grasos insaturados (medidos como FAME's), ni por la acidez, ni por el número de insaturaciones presentes en el aceite (índice de yodo), por el hecho de no presentar coeficientes de correlación altos. Se afirma lo anterior, aún a sabiendas que sea ampliamente conocido, que los aldehídos provienen de los ácidos grasos [16], que la acidez de los aceites influye sobre la producción de algunos aldehídos (por ejemplo, el caso del hexanal) [16], y que la disminución del número de insaturaciones en el aceite, indica un aumento del deterioro de los ácidos graso insaturados. Tal vez, si midiéramos aldehídos totales, y no solo su contenido en el *headpace* del aceite, y si sumáramos el hecho que no se tiene información cuantitativa de los aditivos y antioxidantes, que eventualmente contienen los aceites, pudiéramos reevaluar las afirmaciones enunciadas anteriormente.

CONCLUSIONES

- Se implementó un método para la determinación de aldehídos en aceites, por SPME-GC-ECD con derivación directa sobre la fibra. El método permitió identificar y cuantificar los siguientes aldehídos volátiles en aceites comestibles: etanal, propanal, butanal, pentanal, hexanal y octanal. El método fue rápido (ca. 25 min por muestra), reproducible (CV < 5%), y con un nivel mínimo de cuantificación alrededor de 0.1 μM.
- La linealidad del método, bajo las condiciones establecidas, fue de 0.1-70 μM (con $r^2 > 0.99$), el rango de concentraciones suficiente para determinar los aldehídos volátiles en los aceites comestibles calentados.
- En los aceites comestibles nuevos se pudo detectar, usando el método implementado, la presencia de aldehídos volátiles. El aldehído que se encontró en mayor cantidad fue el etanal, el cual proviene, posiblemente, del material de envase, i.e. poli(etilentereftalato). El método implementado puede usarse en el estudio de la estabilidad oxidativa de aceites comestibles, así como para determinar la eficiencia de antioxidantes empleados.
- En los aceites comestibles, Andaluz, Búcaro, Oleocali y Oliosoya, calentados durante 3, 6 y 9 horas a 190 ± 2 °C, los ácidos grasos saturados no sufrieron degradación oxidativa significativa (estadísticamente). En el caso de los ácidos grasos insaturados, sólo se observó un cambio en su concentración relativa, en los aceites Búcaro, Oleocali y Oliosoya, cuando la muestra se calentó durante 9 horas; y para el caso del aceite Andaluz, a partir de 6 horas.

- En términos de estabilidad, el aceite Búcaro fue el más estable a la reacción de oxidación. Se hace esta afirmación con base en los resultados de la determinación de FAME's e índice de yodo.
- La correlación (r^2) entre los resultados de la determinación de aldehídos volátiles y los de las otras pruebas (FAME's, índice de yodo y grado de acidez) no fue superior a 0.9. Bajo las condiciones experimentales estudiadas, el cambio de la concentración de cada uno de los aldehídos presente en los aceites no se encuentra determinado por el contenido de los ácidos grasos (medidos como FAME's), ni por la acidez, ni por el número de insaturaciones presente en el aceite (índice de yodo). Por tanto, el contenido de aldehídos presentes en los aceites, cuando éstos tienen la posibilidad de intercambiar materia con el ambiente (tal como sucedió en este trabajo), no es posible usarse como indicador del deterioro oxidativo del aceite. Sin embargo, si el interés consiste en hacer un seguimiento del avance del deterioro oxidativo, en muestras oleosas, se recomienda, mantener la muestra herméticamente cerrada, para evitar la pérdida de los compuestos volátiles de la fase vapor, que se encuentran en equilibrio con los congéneres disueltos en el aceite (fase condensada).

RECOMENDACIONES

- Aplicar el método implementado para la determinación de aldehídos en muestras de aceites comestibles sometidos a la fritura de alimentos; como las que se encuentran en los puestos de comida “rápida” y/o restaurantes.
- Evaluar contenido de los aldehídos en aceites comestibles, sometidos a periodos de calentamiento más extensos que los usados en este trabajo, i.e. por encima de 9 horas de calentamiento a 190 ± 2 °C.
- Evaluar si los otros aceites comestibles nuevos, diferentes a las marcas estudiadas en este trabajo, también presentan concentraciones de aldehídos detectables, antes de ser usados.
- Comparar el método implementado en este trabajo para la determinación de aldehídos, con el de la determinación de malondialdehído (prueba del ácido tiobarbitúrico) y/o con el método para la determinación de compuestos polares totales.
- En la implementación de nuevos métodos, para la determinación de aldehídos volátiles, por SPME-GC-ECD con derivación directa sobre la fibra (con PFPH como agente de derivatización), se recomienda aplicar tiempos de derivatización menores a los usados en este trabajo (1 min). Ello con el fin de evaluar qué tanto se puede ampliar el rango dinámico lineal para un método que emplee condiciones semejantes a las usadas en este trabajo.

ANEXOS

Anexo 1. Encuesta para la selección de los aceites estudiados.

ESTIMADO AMIGO (a)

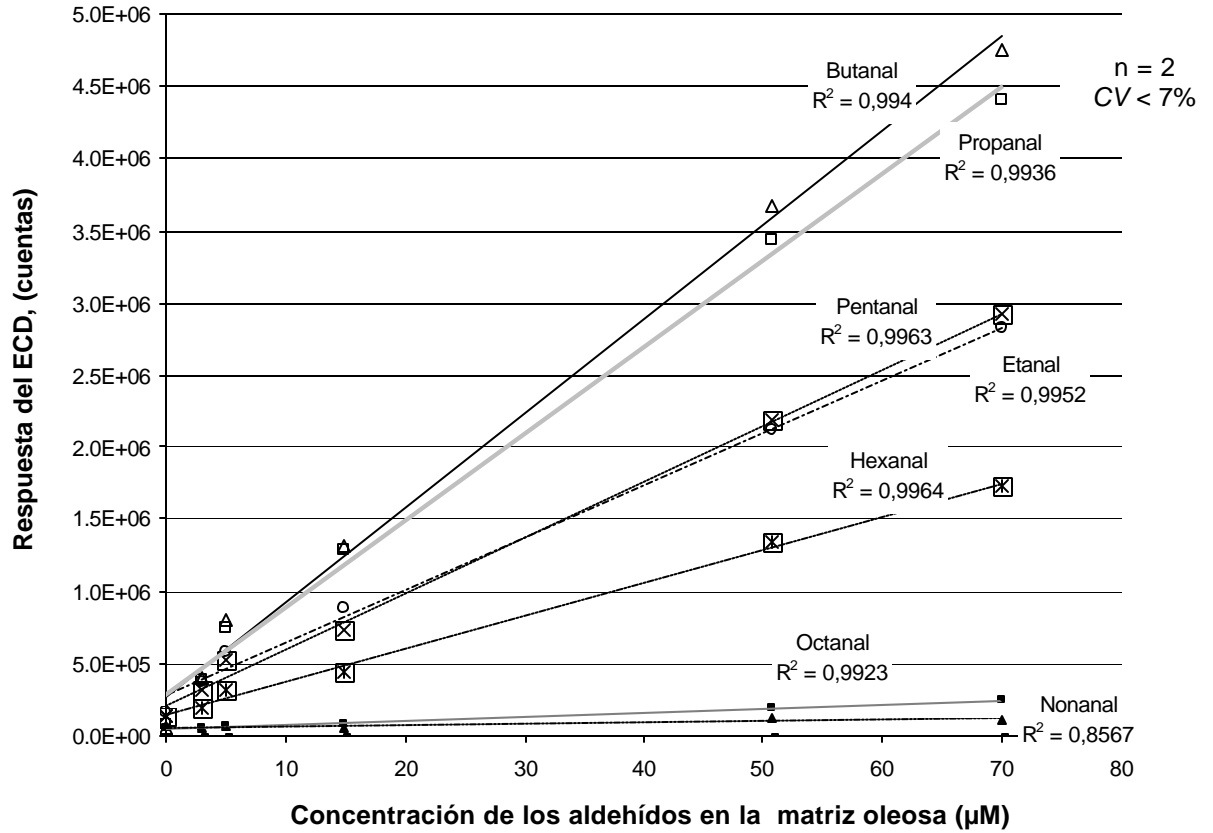
VENDEDOR (a) DE COMIDAS “RÁPIDAS”:

La Escuela de Química de la Universidad Industrial de Santander adelanta un proyecto sobre la calidad de los aceites comestibles distribuidos en la ciudad, y en especial, los usados en los procesos de fritura a temperaturas superiores a 170 °C. Ésto, con el objeto de obtener suficiente información sobre el tema, que pueda ser usada por los servicios de salud de Santander en estudios relacionados con la salud de los consumidores. Para tal fin, los investigadores que participamos en este proyecto, estudiantes y profesores, hemos diseñado la siguiente encuesta para seleccionar los aceites a utilizar en el estudio, y le solicitamos muy comedidamente nos colaboren para tal fin.

NOTA: No son necesarios sus datos personales; esta información será utilizada sólo para fines académicos.

1. ¿Qué marca de aceite prefiere para la fritura de los productos que ofrece?
2. ¿Por qué?

Anexo 2. Curva de calibración para los aldehídos saturados en forma de sus hidrazonas. La matriz oleosa usada fue un aceite comercial (aceite Premier) (ver **Tabla 7**).



Anexo 3. Perfil de ácidos grasos (en forma de sus FAME´s) de los aceites Búcaro, Andaluz, Oleocali y Oliosoja después de 0, 3, 6 y 9 horas de calentamiento (a 190 ± 2 °C, n = 3).

FAME`s	Aceite Búcaro							
	0 horas		3 horas		6 horas		9 horas	
	%p/p	CV (%)	%p/p	CV (%)	%p/p	CV (%)	%p/p	CV (%)
Caprílico	ND	--	0,0	3,2	0,0	6,6	0,1	7,5
Nonanoico	ND	--	ND	--	ND	--	ND	--
Cáprico	ND	--	ND	--	ND	--	ND	--
Undecanoico	ND	--	ND	--	ND	--	ND	--
Láurico	0,1	2,2	0,1	4,5	0,1	2,4	0,1	2,1
Tridecanoico	ND	--	ND	--	ND	--	ND	--
Mirístico	0,5	2,0	0,5	2,3	0,5	3,8	0,5	1,8
Pentadecanoico	ND	--	ND	--	ND	--	ND	--
Palmítico	23,3	5,5	25,8	4,6	23,9	4,0	23,0	4,0
Palmitoleico	0,1	3,7	0,1	9,7	0,1	2,7	0,1	3,5
Heptadecanoico	0,1	5,0	0,1	5,0	0,1	5,7	0,1	4,2
Estearico	3,1	7,7	3,6	5,9	3,2	5,0	3,1	5,6
Oleico	27,8	8,0	32,2	5,9	28,2	5,5	27,0	5,9
Linoleico	14,4	7,5	15,3	5,9	12,6	5,4	11,5	5,7
Nonadecanoico	ND	--	ND	--	ND	--	ND	--
Linolénico	0,8	8,3	0,7	6,0	0,5	8,8	0,5	6,3
Araquídico	0,3	10,4	0,4	7,9	0,4	6,4	0,4	9,4
Eicosanoico	0,1	13,9	0,2	9,7	0,1	9,2	0,1	18,0
Eneicosanoico	ND	--	ND	--	ND	--	ND	--
Behénico	0,1	14,7	0,0	0,8	0,1	91,1	0,1	11,8
Erúcico	ND	--	ND	--	ND	--	ND	--
Nervónico	ND	--	ND	--	ND	--	ND	--

ND - No detectado.

FAME`s	Aceite Andaluz							
	0 horas		3 horas		6 horas		9 horas	
	%p/p	CV (%)	%p/p	CV (%)	%p/p	CV (%)	%p/p	CV (%)
Caprílico	ND	--	ND	--	ND	--	0,1	5,2
Nonanoico	ND	--	ND	--	ND	--	ND	--
Cáprico	ND	--	ND	--	ND	--	ND	--
Undecanoico	ND	--	ND	--	ND	--	ND	--
Láurico	0,2	3,2	0,2	2,2	0,2	2,2	0,2	1,7
Tridecanoico	ND	--	ND	--	ND	--	ND	--
Mirístico	0,7	4,1	0,7	5,0	0,7	3,9	0,7	1,9
Pentadecanoico	0,0	4,4	ND	--	0,0	4,4	0,0	4,8
Palmítico	30,6	3,4	30,4	1,7	29,8	2,4	28,7	4,0
Palmitoleico	0,1	3,6	0,1	3,2	0,1	3,7	0,1	3,9
Heptadecanoico	0,1	4,4	0,1	2,5	0,1	3,5	0,1	4,7
Estearico	3,2	5,8	3,1	4,3	3,1	3,2	3,0	6,0
Oleico	33,3	6,7	32,7	4,1	32,0	4,1	29,9	5,8
Linoleico	7,2	7,7	6,8	5,4	6,4	3,9	5,2	5,5
Nonadecanoico	ND	--	ND	--	ND	--	ND	--
Linolénico	0,1	15,9	0,1	11,8	0,1	15,6	0,1	11,4
Araquídico	0,3	7,6	0,3	5,2	0,4	8,9	0,4	6,9
Eicosanoico	0,1	11,6	0,1	5,8	0,1	11,7	0,1	8,1
Eneicosanoico	ND	--	ND	--	ND	--	ND	--
Behénico	0,1	23,7	0,0	11,4	0,1	17,0	0,1	16,7
Erúcico	ND	--	ND	--	ND	--	ND	--
Nervónico	ND	--	ND	--	ND	--	ND	--

ND - No detectado.

FAME`s	Aceite Oleocali							
	0 horas		3 horas		6 horas		9 horas	
	%p/p	CV (%)	%p/p	CV (%)	%p/p	CV (%)	%p/p	CV (%)
Caprílico	ND	--	ND	--	ND	--	0,1	7,3
Nonanoico	ND	--	ND	--	ND	--	ND	--
Cáprico	ND	--	ND	--	ND	--	ND	--
Undecanoico	ND	--	ND	--	ND	--	ND	--
Láurico	0,2	1,9	0,2	0,3	0,2	1,5	0,2	3,2
Tridecanoico	ND	--	ND	--	ND	--	ND	--
Mirístico	0,7	1,9	0,7	1,1	0,6	2,4	0,7	3,1
Pentadecanoico	0,0	4,9	0,0	5,0	0,0	1,4	ND	--
Palmítico	27,5	3,0	26,3	2,3	26,9	4,7	27,9	5,4
Palmitoleico	0,1	3,0	0,1	2,9	0,1	3,9	0,1	6,9
Heptadecanoico	0,1	2,8	0,1	1,8	0,1	5,3	0,1	5,1
Esteárico	3,4	3,7	3,3	2,4	3,3	5,9	3,6	6,5
Oleico	33,0	4,1	31,6	3,4	31,0	6,2	32,1	6,9
Linoleico	11,0	4,1	9,6	3,3	8,8	5,5	8,5	6,5
Nonadecanoico	ND	--	ND	--	ND	--	ND	--
Linolénico	0,4	7,4	0,3	4,3	0,3	6,2	0,2	8,6
Araquídico	0,3	4,5	0,4	5,5	0,4	8,7	0,5	8,8
Eicosanoico	0,1	7,4	0,1	12,8	0,2	8,8	0,1	14,0
Eneicosanoico	ND	--	ND	--	ND	--	ND	43,3
Behénico	0,2	57,3	0,1	10,1	0,1	20,9	ND	62,9
Erúcico	ND	--	ND	--	ND	--	ND	--
Nervónico	ND	--	ND	--	ND	--	ND	--

ND - No detectado.

FAME`s	Aceite Olivosoya							
	0 horas		3 horas		6 horas		9 horas	
	%p/p	CV (%)	%p/p	CV (%)	%p/p	CV (%)	%p/p	CV (%)
Caprílico	ND	--	ND	--	0,1	4,4	0,1	8,9
Nonanoico	ND	--	ND	--	ND	--	ND	--
Cáprico	ND	--	ND	--	ND	--	ND	--
Undecanoico	ND	--	ND	--	ND	--	ND	--
Láurico	ND	--	ND	--	ND	--	ND	--
Tridecanoico	ND	--	ND	--	ND	--	ND	--
Mirístico	0,1	6,4	0,1	3,0	0,1	6,2	0,1	7,6
Pentadecanoico	ND	--	ND	--	ND	--	ND	--
Palmítico	9,1	6,8	9,2	3,6	9,3	2,8	9,0	12,0
Palmitoleico	0,1	19,4	0,1	7,3	0,1	7,4	0,1	9,5
Heptadecanoico	0,1	6,9	0,1	4,2	0,1	5,1	0,1	9,2
Estearico	2,6	7,8	2,6	5,0	2,7	4,5	2,4	12,6
Oleico	16,6	7,6	16,3	5,0	16,6	3,6	14,8	10,7
Linoleico	36,6	7,5	34,9	5,8	34,5	3,4	28,8	9,3
Nonadecanoico	ND	--	ND	--	ND	--	ND	--
Linolénico	3,2	7,5	2,9	6,5	2,8	4,0	2,1	9,2
Araquídico	0,4	8,1	0,4	6,5	0,4	3,1	0,4	14,6
Eicosanoico	0,2	8,5	0,2	10,1	0,2	2,9	0,2	16,6
Eneicosanoico	0,0	18,1	ND	--	0,0	9,3	0,0	43,8
Behénico	0,4	10,1	0,4	9,2	0,4	4,3	ND	--
Erúcico	ND	--	ND	--	ND	--	ND	--
Nervónico	ND	--	ND	--	ND	--	ND	--

ND - No detectado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. VOET D. and VOET G. J. Biochemistry. s.l. : John Wiley & Sons, 1995. p. 277-314.
2. BENEDETTI, A. and COMPORTI, M. Formation, reactions and toxicity of aldehydes produced in the course of lipids peroxidation in cellular membranes. En: *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*. Vol. 18, (1987); p. 187-202.
3. SCHAUENSTEIN, H.; ESTERBEAUER, H. and ZOLLNER H. Aldehydes in biological systems. (1977); p.181.
4. GOODRIDGE, F. *et al.*, Solid phase microextraction-gas chromatography for quantifying *headspace* hexanal above freeze-dried chicken myofibrils. EN: *J. Agric. Food Chem.*, (2003), 51, p. 4185-4190
5. VICHI S., PIZZALE L., CONTE S. L., Solid phase microextraction in the analysis of virgin olive oil volatile fraction: Modifications induced by oxidation and suitable markers of oxidative status. EN: *J. Agric. Food Chem.*, (2003), 51, p. 6564-6571
6. JELEN H. H. *et al.*, *headspace* solid phase microextraction use for the characterization of volatile compounds in vegetable oils of different sensory quality. EN: *J. Agric. Food Chem.*, (2000), 48, p. 2360-2367
7. YASUHARA A., SHIBAMOTO T., Determination of volatile aliphatic aldehydes in the *headspace* of heated food oils by derivatization with 2-aminoethanethiol. EN: *J. chromatography*, (1991), 547; p. 291-298
8. GACHANJA A. N., LEWIS W. S., WORSFOLD J. P., Determination of aldehydes in used engine oils by liquid chromatography with

- chemiluminescence detection. En: *J. chromatography A*, (1995), 704; p. 329-337
9. ESTERBAUER, H.; SCHAUR J. R. and ZOLLNER H. Chemistry and biochemistry of 4-Hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes (Review). En: *Free Radical Biology & Medicine*. Vol. 11, (1991); p. 81-128.
 10. DERGAI, S. B. Química de los alimentos. México: Longman, 1996. p. 211-277.
 11. POTTE, N. N. La ciencia de los alimentos: Centro Regional de Ayuda Técnica. México: s.n., 1973., p. 488-492.
 12. WEISS, T.J., Food oil and their uses. Pennsylvania: The avi Publishing, 1970. 237 p.
 13. WARNER, K. *et al.* Effect of oleic and linoleic acids on the production of deep-fried odor in heated triolein and trilinolein. En: *J. Agric. Food Chem.* Vol 49. (2001); p. 899-905.
 14. MORALES, T. M.; RIOS, J. J. and APARICIO, R. Changes in the composition of virgin olive oil during oxidation: Flavors an off-flavors. En: *J. Agric. Food Chem.* Vol 45. (1997); p. 2666-2673.
 15. PEREZ, M. C.; MÁRQUEZ, G. y DOBARGANES, M. C. Alteración de grasas usadas en fritura, I: Comportamiento de aceites de oliva y girasol en freidoras doméstica. En: *Grasas y Aceites*. Vol. 38, No 5, (1987); p. 307-312.
 16. FRANKEL, N. E. Recent advances in lipid oxidation (Review). En: *J. Sci. Food Agric.* (1990); p. 495-511.
 17. MINOTTI, G. and AUST D. S. Redox cycling of iron and lipids peroxidation (Review). En: *Lipids*. Vol. 27, No. 3, (1992); p. 219-226.
 18. PSOMIADO, E. and TSIMIDOU, M. Stability of virgen olive oil. 2. Photo-oxidation studies. En: *J. Agric. Food Chem.* Vol. 50, (2002); p. 722-727.

19. PAZ A. y MOLERO M. Aplicación de la espectrofotometría UV-visible al estudio de la estabilidad térmica de aceites vegetales comestibles. En: *Grasas y Aceites*. Vol. 51, No. 6, /2000); p. 424-428.
20. LAZOS, E. S.; TSAKNIS J. y BANTE M. Cambios en aceite de semilla de calabaza durante el calentamiento. En: *Grasas y Aceites*. Vol. 46(4-5), p. 233-239. (1995),
21. RADY, A. H. y MADKOUR M. A. Cambios en las propiedades físicas y químicas de oleína de palma durante el calentamiento. En: *Grasas y Aceites*, Vol. 46, No. 4/5, (1995); p. 270-275.
22. PRYOR, W. A. Free radical in biology. USA: Academic Press, vol 1, capítulo 2, (1976); 145 p.
23. FRANKEL, E. N. Secondary products of lipid oxidation. En: *Chem. Phys. f Lipids*. Vol. 44, (1987); p. 73-85.
24. _____ Volatile lipid oxidation products. En: *Prog. Lipid Res*. Vol. 22. (1982); p. 1-33
25. GRAY J. I. Measurement of lipid oxidation: A Review. En: *JAOCS*. Vol. 55, (1991); p. 539-546.
26. MORRISON, T. R. and BOYD, N. R. Química orgánica. México: Addison-wesley Iberoamericana, 1985; p.732-772.
27. OFFICIAL AND TENTATIVE METHODS OF THE AMERICAN OIL CHEMISTS SOCIETY. Vol 1, 3 ed, (1971).
28. Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA, Colombia), Normatividad relacionada con alimentos, Resolución 126 de 1964 Ministerio de Salud [en línea] , Colombia, INVIMA, Junio 4 de 2002,
<http://www.invima.gov.co/version1/normatividad/alimentos/resolución126de1964.htm>.
29. European Commission. Regulation 1513/2001. *Off. J. Eur. Communities* 2001.

30. Tecnoalimentos, reglamento sanitario de los alimentos, las grasas y los aceites comestibles, Ministerio de Salud de Chile, Decreto Supremo Número 977, artículo 266. [en línea], Chile. 23 octubre de 2004. <http://www.tecnoalimentos.cl/html2/fit10.html#t9P5>
31. ESTERBAUER, H. and CHEESEMAN H.K. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malonaldehyde and 4-hidroxynonenal. En: *Methods in Enzimology*. Vol. 186, (1990); p. 407-414.
32. STASHENKO, E. E. *et al.* Comparison of extraction methods and detection systems in the gas chromatographic analysis of volatile carbonyl compounds. En: *J. Chromatogr. A*. Vol. 79, (1997); p. 360-369.
33. ISO 5509: 1978, Animal and vegetal fat and oil-preparation of methyl ester of fatty acids.
34. STASHENKO, E. E. *et al.* Solid-phase microextraction with on-fibre derivatization applied to the analysis of volatile carbonyl compounds. En: *J. Chromatogr. A*. Vol. 886, (2000); p. 175-181.
35. Vichi S., Pizzale L., Conte S. L., Solid phase microextraction in the analysis of virgin olive oil volatile fraction: Characterization of virgin olive oils from two distinct geographical areas or northern Italy. EN: *J. Agric. Food Chem.*, (2003), 51; p. 6572-6577.
36. Pawliszyn J., solid phase microextraction, Theory and practice. New York: Wiley-VCH, 1997; p. 43-89
37. Vesely P. *et al.*, Analysis of aldehydes in beer using solid-phase microextraction with on-fiber derivatization and gas chromatography/mass spectrometry. EN : *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51; p. 6941-6944
38. Ai J., Solid-phase microextraction for quantitative analysis in nonequilibrium situations, EN : *Anal. Chem.* 1997 69, p. 1230-1236

39. Ai J., *Headspace* solid-phase microextraction. Dynamics and quantitative analysis before reaching a partition equilibrium, EN : *Anal. Chem.* 1997, 69, p. 3260-3266.
40. Ai J., Solid-phase microextraction in *headspace* analysis. Dynamics in non-steady state mass transfer. EN : *Anal. Chem.* 1998, 70; p. 4822-4826
41. MADRID V.; CENSANO C. Y MADRID C. Manual de aceites y grasas comestibles. Iragra, (1997); p.144-313.
42. NOVAK, J. Quantitative analysis by gas chromatography. New York: Marcel Dekker, (1988); p. 85-88.
43. Otteneder M., Plastaras P. J., and Marnett J. L. Reaction of malondialdehyde-DNA adducts with Hydrazines-development of a facile assay for quantification of equivalents in DNA. EN: *Chem. Res. Toxicol.* 2002, 15; p. 312-318.
44. GROSCH B., Food chemistry, Germany, 2 ed. Springer (1999), p. 152-234.
45. FERREIRA C. M., Desarrollo y validación de un método para el análisis cuantitativo de compuesto carbonílicos, productos finales de degradación oxidativa de lípidos, tesis de grado (19997). p. 40-60