

Universidad de Sevilla
FACULTAD DE FARMACIA

Programa de Doctorado en Farmacia

DETERMINACIÓN DE GRASA *TRANS* EN PRODUCTOS ALIMENTARIOS EN
ESPAÑA POR APLICACIÓN DE LA ESPECTROFOTOMETRÍA INFRARROJA
POR TRANSFORMADAS DE FOURIER Y REFLEXIÓN TOTAL ATENUADA DE
SEGUNDA DERIVADA (ATR-FTIR (-2D))



Tesis Doctoral

Doctoranda: Sara Galvin Leyton

Directores: Profa. Dra. María Violante de Paz Báñez

Prof. Dr. Matías Guzmán Chozas

Sevilla, 2024

AGRADECIMIENTOS

Desde el inicio de la tesis doctoral son muchas las personas a las que quiero mostrar mi agradecimiento.

En primer lugar, a mis directores. Al Prof. Dr. Matías Guzmán Chozas por confiar en mí desde que llegué a la Facultad. Por todo su tiempo, cercanía, preocupación, implicación y paciencia. Por guiarme y acompañarme en este camino. Por todas las oportunidades y sueños que me ha brindado y, sobre todo, por la enseñanza a nivel personal y profesional que ha dejado en mí.

A la Profa. Dra. María Violante de Paz Báñez, por su ayuda en todo momento. Jamás podré agradecer todo el tiempo que ha invertido en este estudio, por su dedicación y por contagiarme de esas buenas sensaciones. Gracias por ayudarme en las circunstancias adversas y a tener paciencia.

Agradezco a la Profa. Dra. Remedios Guillén Sans por su apoyo, sugerencias, aportaciones, pero, sobre todo, por el tiempo compartido, que han permitido enriquecerme y disfrutar de este proceso.

Agradecemos la provisión de muestras de margarinas al proveedor comercial D. Antonio Moreno Maqueda. Y la disponibilidad de instrumentación en los ensayos de los aceites vegetales comestibles al Prof. Dr. Manuel Galán Vioque.

También quiero dar las gracias al Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica por el apoyo y por darme la oportunidad de integrarme en el equipo de trabajo.

Por otro lado, debo nombrar a todas aquellas personas que han estado a mi lado durante toda la investigación.

A mis padres, habéis sido mi pilar fundamental, las personas que más habéis estado día tras día dándome ánimos. Gracias por la paciencia que habéis tenido conmigo, por enseñarme a luchar y por vuestro apoyo incondicional.

Gracias también a mis “hermanos pequeños” por vuestro apoyo, consejos y comprensión y cariño en los momentos difíciles.

A mi sobrino, aquel que entraba a mi habitación con esa sonrisa y me contagiaba de alegría. Ahora es el momento de dedicarte todo mi tiempo. Eres mi luz.

A mis compañeras de vida, las que han estado día tras día dándome fuerza, no dejándome caer, ofreciéndome todo su cariño y energía, por entender mi situación y estar al otro lado esperándome. No tengo palabras para expresar todo lo que me habéis apoyado y la confianza depositada en mí, solo puedo daros las gracias por estar a mi lado y vivir esta experiencia juntas.

Y, por último, la más especial y a la que va dedicada mi Tesis Doctoral, a mi hermana, por ser un ejemplo que seguir. Me has enseñado durante todos estos años que, frente a una adversidad, debes de poner toda tu fuerza, ganas, energía, una gran sonrisa y luchar por aquello que quieres conseguir. Gracias por estar siempre a mi lado.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS	1
ÍNDICE DE FIGURAS	3
ABREVIATURAS	5
RESUMEN	9
ABSTRACT	11
Capítulo 1. Introducción: Definiciones y conceptos, ingestas poblacionales, efectos sobre la salud, determinación de grasa <i>trans</i> en productos alimentarios.....	15
1.1 Hidrogenación parcial de los aceites insaturados.....	18
1.2 <i>Trans</i>-isomerización inducida por radicales libres.....	20
1.3 Uso y ventajas tecnológicas de los aceites parcialmente hidrogenados	20
1.4 Ácidos grasos <i>trans</i> procedentes de rumiantes (R-TFA).....	21
1.5 Ácidos linoleicos conjugados (CLAs).....	24
1.6 Ingestas de grasa <i>trans</i>	25
1.6.1 <i>El Estudio TRANSFAIR</i>	31
1.7 Ácidos grasos <i>trans</i> y perfil lipídico	35
1.8 Efectos de la grasa <i>trans</i> sobre la salud	36
1.8.1 <i>Cardiovascular</i>	38
1.8.2 <i>Tipo de fuente</i>	38
1.8.3 <i>Diabetes tipo-2</i>	40
1.8.4 <i>Grasa <i>trans</i>, maternidad y lactancia</i>	40
1.8.5 <i>Deterioro cognitivo y Alzheimer</i>	41
1.8.6 <i>Obesidad</i>	42
1.8.7 <i>Capacidad Reproductora</i>	42
1.9 Alternativas a los aceites hidrogenados. Reformulaciones.....	43
1.9.1 <i>Interesterificación química</i>	45
1.9.2 <i>Interesterificación enzimática</i>	45
1.9.3 <i>Fraccionamiento</i>	46

1.9.4 Organogeles	47
1.9.5 Aplicación de la ingeniería genética	47
1.10 Análisis de la grasa <i>trans</i>.....	48
1.10.1 Cromatografía de gases	48
1.10.2 Espectroscopía infrarroja	49
1.10.3 Aplicación de la espectrofotometría infrarroja a la determinación de grasa <i>trans</i> por transformada de Fourier y reflexión total atenuada (ATR-FTIR).....	51
1.10.4 Método de espectroscopía infrarroja ATR-FTIR de segunda derivada	54
Capítulo 2: Legislación y Recomendaciones	57
2.1 Dinamarca	59
2.2. Canadá.....	61
2.3 Estados Unidos.....	62
2.3.1 Nueva York y otras localidades de Estados Unidos	64
2.4 Unión Europea	65
2.5 Europa	67
2.6 España	68
2.7 Sudamérica.....	69
2.8 Asia.....	71
2.9 África	72
2.10 India y Pakistán	73
2.11 Australia y Nueva Zelanda	74
2.12 Organización Mundial de la Salud (OMS).....	75
Capítulo 3: Determinación de grasa <i>trans</i> por el método espectroscópico ATR-FTIR (-2D) de segunda derivada.....	81
3.1. Introducción	81
3.2. Material y Métodos.....	85
3.2.1 Reactivos.....	85
3.2.2 Aparatos	86
3.2.3 Muestras	86

3.2.4 Procedimientos	87
3.2.5 Análisis estadístico	89
3.3 Resultados	90
3.4 Discusión.....	93
3.4.1 Límites de grasa trans	93
3.4.2 Niveles de grasa trans en margarinas	94
3.4.3 Evaluación de la grasa trans en las margarinas españolas.....	99
3.4.4. Ingestas de grasa trans por consumo de margarinas	100
3.4.5 Alternativas tecnológicas al uso de aceites parcialmente hidrogenados en la fabricación de margarinas	101
3.5 Conclusiones.....	103
Capítulo 4.1: Determinación de grasa trans en productos alimentarios escogidos	109
4.1.1 Introducción.....	109
4.1.2. Material y Métodos.....	111
4.1.2.1 Reactivos y Aparatos	111
4.1.2.2 Muestras	112
4.1.2.3 Calibración del método	112
4.1.2.4 Tratamiento de las muestras	114
4.1.2.5 Procedimiento espectrofotométrico ATR-FTIR (-2D) de segunda derivada (AOCS, 2009)	115
4.1.3 Resultados	116
4.1.4 Discusión.....	117
4.1.5 Conclusiones.....	128
Capítulo 4.2: Determinación de grasa trans y parámetros de calidad y autenticidad en aceites vegetales comestibles de oliva, girasol y maíz.....	133
4.2.1 Introducción.....	133
4.2.2 Material y Métodos.....	135
4.2.2.1 Reactivos y Aparatos	135
4.2.2.1.1 Reactivos.....	135

4.2.2.1.2 Aparatos	136
4.2.2.2 Muestras	136
4.2.2.3 Procedimientos	138
4.2.3 Resultados	140
4.2.4 Discusión.....	147
Capítulo 5: Incidencia de cáncer de mama asociado a las ingestas de grasa <i>trans</i>: meta-análisis de estudios caso-control	161
5.1 Introducción.....	161
5.2 Metodología.....	162
5.2.1 Elegibilidad. Extracción de datos	162
5.2.2 Criterios de exclusión.....	163
5.2.3 Riesgo de sesgo (calidad del estudio)	163
5.2.4 Heterogeneidad	165
5.2.5 Síntesis de resultados. Modelos de efectos fijos y efectos aleatorios.....	166
5.2.6 Análisis adicionales	167
5.2.7 Estadística	168
5.3 Resultados y Discusión	169
5.3.1 Selección de los estudios	169
5.3.2 Características de los estudios	170
5.3.3 Riesgo de sesgo.....	176
5.3.4 Magnitud del efecto: síntesis cuantitativa	180
5.3.5 Análisis de sensibilidad	185
5.3.6 Fortalezas, limitaciones y conclusiones	187
5.4 Conclusiones.....	189
CONCLUSIONES FINALES.....	191
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	197

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Contenidos estacionales de TFAs en mantequillas francesas (Morin, 2005)..	23
Tabla 2. Porcentajes de TFA, sobre grasa total, en tejido adiposo en las poblaciones de distintos países (Combe et al., 1998).....	26
Tabla 3. Evaluación de las ingestas de grasa trans en distintos países.....	27
Tabla 4. Límites máximos recomendados de ingesta de grasa trans	32
Tabla 5. Comparación entre las interesterificaciones química y enzimática (List, 2004)	46
Tabla 6. Características espectrales de los posibles estándares cero-trans.....	85
Tabla 7. Contenido de grasas trans de las margarinas ensayadas (Galvin et al., 2016)	92
Tabla 8. Contenido de grasa trans (porcentaje sobre grasa total) en margarinas de varios países	96
Tabla 9. Contenido de grasa trans en margarinas en España.....	100
Tabla 10. Calibración del método aplicado	113
Tabla 11. Contenido de grasa trans de los productos alimentarios ensayados	118
Tabla 12. Índices de aterogenicidad (IA) ^a	119
Tabla 13. Evolución del contenido de grasa trans en las galletas.....	121
Tabla 14. Evaluación de los niveles de grasa trans en patatas fritas de establecimientos de comida rápida.....	127
Tabla 15. Datos para construir la línea del tiempo para patatas fritas de comida rápida en España.....	128
Tabla 16. Muestras de aceites vegetales comestibles estudiadas	137

Tabla 17. Valores normativos de la CEE para los parámetros de autenticidad y calidad de los aceites vegetales comestibles ensayados.....	141
Tabla 18. Índice de acidez (% oleico) de los aceites vegetales comestibles ensayados	142
Tabla 19. Índice de peróxidos de los aceites vegetales comestibles ensayados	143
Tabla 20. Índice de refracción a 25 °C de los aceites vegetales comestibles ensayados	144
Tabla 21. Extinciones específicas en el UV de los aceites vegetales comestibles ensayados.....	145
Tabla 22. Contenido de ácidos grasos trans en los aceites vegetales comestibles ensayados.....	146
Tabla 23. Parámetros de calidad y autenticidad de los aceites vegetales comestibles ensayados que lo declaran en el etiquetado nutricional.....	148
Tabla 24. Parámetros de calidad aceite de girasol refinado 80% oleico	153
Tabla 25. Nivel de correlación entre el %TFA en las muestras de aceites vegetales ensayadas y los parámetros de calidad y autenticidad.....	157
Tabla 26. Correlación inversa entre acidez y %TFA en aceites vegetales ensayados.	158
Tabla 27. Índice I ² y grado de heterogeneidad.....	166
Tabla 28. Características de los estudios implicados en el meta-análisis.....	171
Tabla 29. Confección de la Newcastle Ottawa Scale (NOS) para evaluar los riesgos de sesgo en los estudios del meta-análisis.....	179
Tabla 30. Análisis de sensibilidad	186

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Estructuras comparadas de los ácidos grasos <i>cis</i> y <i>trans</i>	16
Fig. 2. Vía alternativa en la hidrogenación de los aceites: formación de ácidos grasos <i>trans</i>	19
Fig. 3. Vías de transformación de los ácidos grasos insaturados de la dieta en los rumiantes.	21
Fig. 4. Distribución de los isómeros <i>trans</i> -18:1 en grasa láctea de (A) cabra, (B) vaca, (C) mujer y (D) vegetal hidrogenado. El eje de abscisas muestra la posición de doble enlace en la cadena hidrocarbonada.....	22
Fig. 5. Línea del tiempo de las principales medidas legislativas sobre la grasa <i>trans</i>	58
Fig. 6. Esquema tradicional de la fabricación de la margarina	82
Fig. 7. Penetración por cristal ATR: reflexión total atenuada.....	89
Fig. 8. Región del espectro que exhibe la banda de deformación del doble enlace <i>trans</i> , en escala expandida para el espectro de segunda derivada negativa, para una mezcla trielaidina-tripalmitina, con un nivel <i>trans</i> de 40,15% (pico 8), como porcentaje sobre grasa total. La altura de la banda de la segunda derivada negativa puede medirse exactamente, para cualquier muestra que se ensaye, a partir de la misma línea-base horizontal (Y=cero). Se observa cómo no hay solapamiento de la banda <i>trans</i> con las bandas colindantes.	90
Fig. 9. Recta de calibrado construida a partir de las mezclas estándares tripalmitina-trielaidina mediante el método ATR-FTIR de la segunda derivada. El porcentaje (%) de trielaidina en la mezcla binaria marca el nivel (%) de ácidos grasos <i>trans</i> (TFA), sobre grasa total.....	91
Fig. 10. Línea del tiempo para patatas fritas de comida rápida en España.	128

Fig. 11. Diagrama de flujo para la búsqueda bibliográfica	170
Fig. 12. Gráfico en embudo.....	177
Fig. 13. Gráfico de Egger	178
Fig. 14. Datos calculados para el diagrama de bosque.....	183
Fig. 15. Gráfico de Galbraith.....	184

ABREVIATURAS

ADA	<i>American Dietetic Association</i>
AFSSA	Agencia Francesa de Seguridad Alimentaria
AHA	<i>American Heart Association</i>
AINES	Anti-inflamatorios no esteroideos
ANVISA	Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria de Brasil
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
AOCS	<i>American Oil Chemists' Society</i>
ATR	<i>Attenuated Total Reflectance</i>
ATR-FTIR	<i>Attenuated Total Reflectance-Fourier transform infrared</i>
BEDCA	Base de datos española de composición de alimentos
CAE	Código Alimentario Español
¹³C-NMR	<i>Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance</i>
CE	Comisión Europea
CLAs	<i>Conjugated linoleic acid</i>
COE	Consejo Oleícola Internacional
DHA	<i>Docosahexaenoic-acid</i>
DTGS	Detector del sulfato de triglicina deuterado
EFA s	<i>Essential Fatty Acids</i>
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
FAME s	<i>Fatty Acid Methyl Ester</i>

FDA	<i>Food & Drug Administration</i>
FDR	<i>Food and Drug Regulations</i>
FFQ	<i>Food frequency questionnaire</i>
FSSAI	<i>Food Safety and Standards Authority of India</i>
GC-FID	<i>Gas Chromatography-Flame Ionization Detector</i>
GC-MS	<i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i>
IFBA	<i>International Food and Beverage Alliance</i>
IMC	Índice de masa corporal
IP-TFA	<i>Industrially produced trans fatty acids</i>
LDPE	<i>Low Density PolyEthylene</i>
MIR	<i>Mid-Infrared Reflectance</i>
MUFA	<i>Mono-unsaturated fatty acids</i>
NAOS	Estrategia para la Nutrición, Actividad Física y Prevención de la Obesidad
NHS	<i>Nurses' Health Study</i>
NIR	<i>Near Infrared Reflectance</i>
NOS	<i>Newcastle-Ottawa Scale</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud
OR	<i>Odds ratio</i> , razón de probabilidades
PHVO	<i>Partially hydrogenated vegetable oils</i>
PPAR	<i>Peroxisome Proliferator Activated Receptor</i>

PRISMA	<i>Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analysis</i>
PUFA	<i>Poly-unsaturated fatty acids</i>
R-TFA	<i>Ruminant Trans Fatty Acids</i>
RD	<i>Risk difference</i>
RR	Riesgo relativo, ratio de riesgo
SD	<i>Standard desviation</i>
SFA	<i>Saturated Fatty Acids</i>
SNR	<i>Signal-to-Noise Ratio</i>
SOE	<i>Strength of evidence</i>
SUN	<i>Scaling Up Nutrition</i>
TE	Trielaidina
TFA	<i>Trans fatty acids</i>
TO	Trioleína
TP	Tripalmitina
UE	Unión Europea
USDA	<i>United States Department of Agriculture</i>

RESUMEN

Los ácidos grasos *trans* son más perjudiciales desde el punto de vista nutricional que los ácidos grasos saturados. Una ingesta excesiva de grasa *trans* afecta principalmente al sistema cardiovascular, aumentando la incidencia de cáncer y otras patologías. En 2004, Dinamarca y Canadá lideraron la limitación de su contenido en alimentos al 2% sobre grasa total. Otra medida adoptada fue la obligatoriedad de incluir información sobre grasa *trans* en el etiquetado, propuesta por la *Food and Drug Administration* (FDA) de EE. UU. a partir de 2006. En 2015, La FDA prohibió uso de aceites parcialmente hidrogenados, principal fuente de los ácidos grasos *trans* de origen industrial. En 2019, la Comisión Europea finalmente restringió el contenido de grasa *trans* de origen industrial en alimentos del 2%, sobre grasa total. Aún existen regiones en países del Este Europeo, antiguas repúblicas soviéticas, zonas asiáticas (India y Pakistán) y gran parte de África donde se detectan cifras muy altas y preocupantes de grasa *trans* en alimentos procesados, debido a la falta de regulaciones efectivas. La Organización Mundial de la Salud (OMS) está implementando el programa REPLACE para eliminar el uso de la grasa *trans* a nivel mundial.

En este trabajo se analizaron margarinas españolas reformuladas (“cero *trans*”) que presentaban niveles de grasa *trans* inferiores al 0,5%, sobre grasa total. Se empleó el método de análisis de infrarrojos ATR-FTIR (-2D) de segunda derivada, el cual se demostró ser más rápido, eficaz y sencillo que el método de cromatografía de gases. Antes de las reformulaciones, la carga de grasa *trans* en margarinas era muy alta en países como Canadá, Estados Unidos o Países Bajos. Se evaluaron también varios productos tradicionalmente ricos en grasa *trans* (*dónuts*, galletas, *snacks*, palomitas de maíz, sopas deshidratadas y alimentos de comida rápida), encontrando que los niveles de grasa *trans* eran inferiores al 1% sobre la grasa total, excepto en los casos de las palomitas de maíz y las patatas fritas de McDonald's, que oscilaron entre el 1,1% y el 2%. En ningún caso se superó el límite legal del 2%.

De las 23 muestras de aceites vegetales comestibles analizadas (oliva, girasol, maíz), sólo 7 proporcionaban información sobre los índices de calidad y autenticidad (índices de acidez, peróxidos, refracción, extinciones específicas en el UV), sin hacer mención específica a los ácidos grasos *trans*. Algunas muestras mostraban índices de estar

oxidados. En los aceites refinados, los niveles de grasa *trans* oscilaban entre el 1% y del 2%. Mantener estos niveles por debajo del 1% resulta difícil y poco realista, especialmente en el caso de la refinación física, si la temperatura supera los 240°C.

El meta-análisis de los estudios caso-control de los últimos años sobre la asociación entre el consumo excesivo de grasa *trans* y el riesgo de incidencia de cáncer de mama indicó un incremento del riesgo de hasta un 41% (“odds ratio”=1,41). Se han analizado las fortalezas, limitaciones y conclusiones acerca de estos estudios caso-control.

ABSTRACT

From a nutritional point of view, *trans*-fatty acids are even more harmful than saturated fatty acids. Excessive intake of *trans* fat primarily affects the cardiovascular system, increasing the incidence of cancer and other pathologies. In 2004, Denmark and Canada led the way in limiting *trans*-fat content in food to 2% of total fat. Another measure implemented was the mandatory inclusion of *trans* fat information on labeling, proposed by the U.S. Food and Drug Administration (FDA) starting in 2006. In 2015, the FDA banned the use of partially hydrogenated oils, the main source of industrially produced *trans* fatty acids. In 2019, the European Commission finally restricted industrial *trans*-fat content in food to 2% of total fat. There are still regions in Eastern European countries, former Soviet republics, Asian areas (India and Pakistan), and much of Africa where very high and concerning levels of *trans* fat in processed foods are reported due to ineffective regulations. The World Health Organization (WHO) is implementing the REPLACE program to eliminate trans fat use globally.

In this study, reformulated Spanish margarines ("zero *trans*") were analyzed, showing *trans*-fat levels below 0.5% of total fat. The second derivative ATR-FTIR (-2D) infrared analysis method was used, proving to be faster, more effective, and simpler than gas chromatography. Prior to the reformulations, the *trans*-fat content in margarines was very high in countries like Canada, the United States, or the Netherlands. Various products traditionally high in *trans*-fat (doughnuts, biscuits, snacks, popcorn, dried soups, and fast food) were also evaluated, revealing that *trans*-fat levels were below 1% of total fat, except for cases like McDonald's popcorn and French fries, which ranged from 1.1% to 2%. In no instance did they exceed the legal limit of 2%.

Out of the 23 samples of edible vegetable oils analyzed (olive, sunflower, corn), only 7 provided information on quality and authenticity indices (acidity, peroxides, refraction, specific UV extinctions), without specific mention of *trans* fatty acids. Some samples showed signs of being oxidized. In refined oils, *trans* fat levels ranged between 1% and 2%. Keeping these levels below 1% is challenging and unrealistic, especially in the case of physical refining, if the temperature exceeds 240°C.

The meta-analysis of case-control studies in recent years on the association between excessive *trans*-fat consumption and the risk of breast cancer indicated an increased risk of up to 41% (odds ratio = 1.41). The strengths, limitations, and conclusions of these case-control studies have been analyzed.

CAPÍTULO 1:

Introducción: Definiciones y conceptos, ingestas poblacionales, efectos sobre la salud, determinación de grasa *trans* en productos alimentarios

Capítulo 1. Introducción: Definiciones y conceptos, ingestas poblacionales, efectos sobre la salud, determinación de grasa *trans* en productos alimentarios

Los ácidos grasos *trans* (TFA) son definidos por la “Food & Drug Administration” (FDA) americana como “los ácidos grasos insaturados que contienen uno o más dobles enlaces aislados (no conjugados) en configuración *trans*” (FDA, 2003). Dinamarca y Canadá se acogen a la misma definición.

El “Codex Alimentarius Mundi” propone una definición similar. Los define como “todos los isómeros geométricos de ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) y poliinsaturados (PUFA) que presentan dobles enlaces no-conjugados; interrumpidos por, al menos, un grupo metileno, que se forman durante la hidrogenación de aceites y grasas en presencia de catalizadores químicos” (Codex Alimentarius, 2006).

Para la “European Food Safety Authority (EFSA)” un ácido graso *trans* “es un ácido graso insaturado que presenta, al menos, un doble enlace en configuración *trans*. Algunos presentan una estructura conjugada (por ejemplo: ácidos linoleicos conjugados (CLAs) en grasa láctea), pero la mayoría presentan dobles enlaces aislados” (EFSA, 2004). En la misma línea, la “Agencia de Seguridad Alimentaria de Francia (AFSSA)” definió a los ácidos grasos *trans* como “cualquier ácido graso insaturado que presenta uno o más dobles enlaces en configuración *trans*”. La Agencia francesa (AFSSA) se decantó por esta definición, argumentando que los CLAs se metabolizaban siguiendo las mismas rutas metabólicas que los enlaces *trans* aislados y que al menos, se sabía que el isómero *trans*-10, *cis*-12 CLA presentaba efectos adversos (esteatosis hepática). Sin embargo, predomina la definición que no incluye a los CLAs (FDA, Codex, Dinamarca...), basándose en que los CLAs podrían ser beneficiosos para la salud, por ejemplo, como anti-aterogénicos y anti-cancerígenos, aunque aún sea un tema a debate, que exige mayor investigación (Ledoux *et al.*, 2007; Wahle *et al.*, 2004).

Etimológicamente *cis*- (latín) significa “sobre este lado”, mientras que *trans* (latín) significa “atravesado”. La disposición en *zig-zag* de los -CH- del doble enlace *trans* endurecen la cadena hidrocarbonada en comparación con el enlace *cis*- siendo característica la vibración de flexión fuera del plano con torsión. Los ácidos grasos con enlace *cis*- (predominan en la naturaleza, salvo muy raras excepciones, como en algunos

Capítulo 1

Introducción: Definiciones y conceptos, ingestas poblacionales, efectos sobre la salud, determinación de grasa trans en productos alimentarios

marsupiales o en membranas cloroplásticas de algas) son líquidos a temperatura ambiente (ácido oleico, punto de fusión 14 °C), mientras que las formas *trans*, que se asemejan a la estructura lineal de los ácidos grasos saturados, son sólidas (ácido elaídico, punto de fusión 45 °C) (Figura 1).

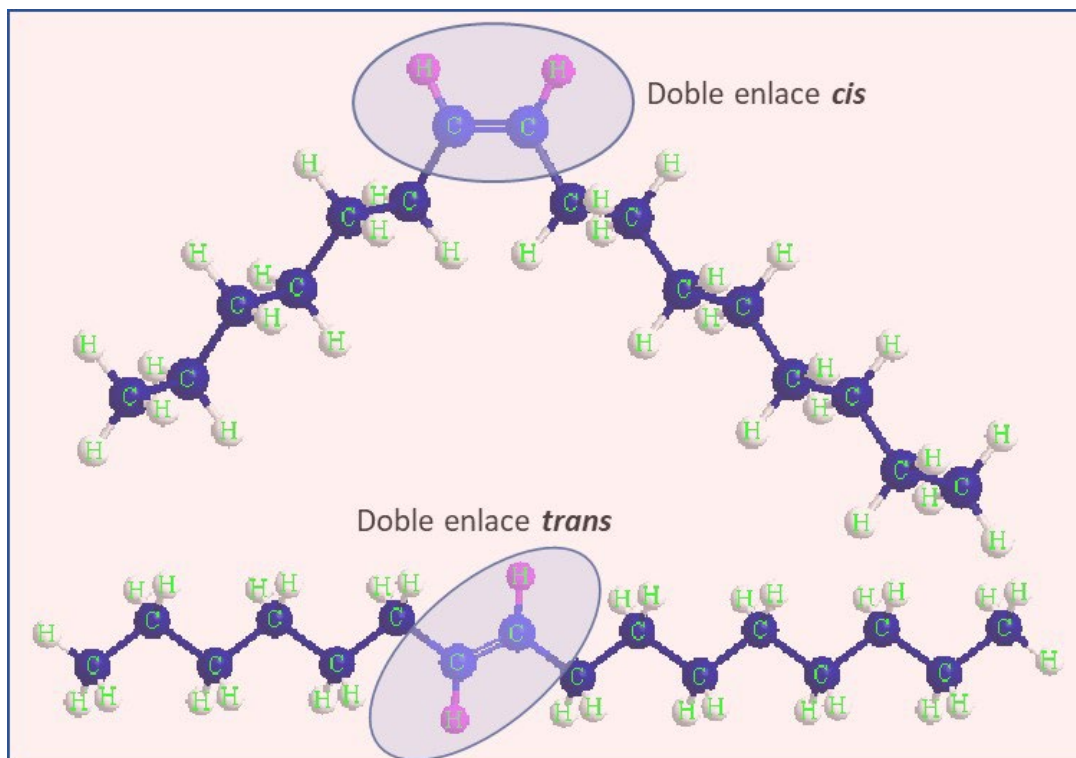


Fig. 1. Estructuras comparadas de los ácidos grasos *cis* y *trans*.

Para que tenga lugar la isomerización geométrica debe superarse una energía de activación de 65 kcal/mol, pasando la configuración *cis* a la configuración *trans*, que es termodinámicamente más estable, aumentando el punto de fusión y cambiando la polaridad del ácido graso.

Las fuentes, o el origen, de la grasa *trans* (TFAs), se pueden encontrar o bien en el procesamiento de los alimentos, y se les conoce como los producidos industrialmente (IP-TFA), a través de:

- Hidrogenación parcial catalítica de aceites vegetales o de aceites de pescado insaturados.
- Frituras con aceites vegetales.
- Blanqueamiento/desodorización, etapas en la refinación de aceites vegetales.
- Irradiación de alimentos.

Capítulo 1

Introducción: Definiciones y conceptos, ingestas poblacionales, efectos sobre la salud, determinación de grasa trans en productos alimentarios

O bien, pueden ser de origen natural, producidas en la biohidrogenación bacteriana de los ácidos linoleico y α -linolénico en el rumen de los animales rumiantes, y que se encontrarían en la leche (lácteos) y carne de rumiantes.

La absorción intestinal y digestión de los TFAs es prácticamente la misma que la forma *cis*, pudiéndose así incorporar posteriormente, en distinta extensión, en tejidos y órganos. Así, después de absorbidos, se incorporan de forma usual al tejido adiposo, glándulas mamarias, y los fosfolípidos de membrana de eritrocitos. La inclusión es menos aparente en corazón y cerebro y un poco mayor en hígado (Valenzuela & Morgado, 1999). Por consiguiente, las concentraciones de TFAs en sangre y tejidos biológicos humanos reflejan sus ingestas en nuestra dieta. El tejido adiposo, con un recambio lento (vida media: 1-2 años) puede considerarse la mejor opción para evaluar la ingesta de grasa *trans* a largo plazo. Los glóbulos rojos, con un recambio moderado (vida media: 1-4 meses) sirven para evaluar las ingestas a medio plazo. El plasma y el suero sanguíneo, con un recambio rápido (vida media: 5-10 días) son útiles para ingestas a corto plazo y la adquisición de sus muestras es más accesibles. La concentración en leche materna refleja la ingesta del día anterior (Arab, 2003).

La isomería geométrica se intuyó en 1819, fecha en la que Poutet, un farmacéutico de Marsella, consiguió transformar trioleína en trielaídina empleando una mezcla de mercurio y de “ácido azótico” (ácido nítrico) (Jart, 1961). Este tipo de isomerización del ácido oleico en presencia de óxidos de nitrógeno (NO, NO₂) se conoció más tarde como la “reacción de la elaídina”, en el equilibrio ácido oleico-ácido elaídico se forma el isómero *trans* en un 66% (Griffiths & Hilditch, 1932). Moore, en 1919, encontró que el componente predominante del ácido iso-oleico, obtenido por hidrogenación del oleato de etilo, era el ácido elaídico.

Pero la caracterización espectral en el infrarrojo del doble enlace *trans* fue presentada por (Rasmussen *et al.*, 1947) trabajando con octenos en una refinería de petróleo en California. Por la misma época, se detectó la banda *trans* a 10,36 μm (968 cm^{-1}) en el aceite de linaza hidrogenado. Dicha banda también aparecía en el espectro de infrarrojos de otros aceites parcialmente hidrogenados y en aceites vegetales tratados con Selenio a 220 °C. Por medidas del índice de iodo se pudo confirmar que la intensidad de absorción a 968 cm^{-1} era proporcional a la extensión con que se producía la isomería *cis* o *trans* (Lemon & Cross, 1949).

1.1 Hidrogenación parcial de los aceites insaturados

El proceso de hidrogenación de los aceites insaturados fue patentado por primera vez en 1902, por el químico alemán Wilhelm Normann, basándose en los trabajos de Paul Sabatier en 1890 sobre la química de la hidrogenación en fase vapor de compuestos orgánicos insaturados, catalizada por níquel. En 1906 este proceso fue implementado en Inglaterra por Joseph Crossfield para el endurecimiento del aceite de ballena. La primera grasa hidrogenada totalmente vegetal se denominó “crisco” (un acrónimo de “crystallized cottonseed oil”), y fue fabricada por Procter & Gamble en 1911 en los Estados Unidos, adquiriendo los derechos de la patente original germana de Normann. Se publicitó como una grasa semi-sólida “más saludable” y más barata que la manteca, la grasa animal más consumida por entonces (Philippaerts *et al.*, 2013).

Pocos procesos tecnológicos han tenido tanta trascendencia en la industria alimentaria de los aceites y grasas, y tan gran impacto económico. Por poner un ejemplo, en los años sesenta se hidrogenaban anualmente en Estados Unidos unos 1.500 millones de litros de aceite vegetal, esencialmente de soja. ¿Qué se pretendía con la hidrogenación parcial? Evidentemente, encontrar una grasa vegetal artificial que sustituyera inicialmente al sebo de bovino y a la manteca, y a la mantequilla después, en base a que la grasa saturada era perjudicial para el sistema cardiovascular. Partiendo de un aceite vegetal (o de pescado) líquido se pretendía conseguir por hidrogenación (saturación) parcial de los dobles enlaces, y controlando las variables del proceso, un producto semi-sólido que presentara la consistencia, plasticidad, propiedades reológicas y organolépticas deseadas en un cierto rango de temperaturas. Ese era el propósito primario. Un propósito secundario fue reducir la insaturación (ácidos linoleico y linolénico) ostensiblemente, porque esto contribuiría a la estabilidad frente a la rancidez oxidativa (Allen, 1960).

En la reacción de hidrogenación parcial de los aceites insaturados los dobles enlaces de los ácidos monoenoicos (MUFA) y polienoicos (PUFA) pasaban a enlaces simples, convirtiéndose, en la práctica, en ácido esteárico. Sin embargo, en las condiciones en que se desarrollaba la reacción (con elevadas temperaturas, presión y agitación, más la actividad de los catalizadores) parte de los ácidos grasos (oleico, linoleico, α -linolénico) sufría isomería geométrica y posicional, pasando de ácidos grasos *cis* hasta ácidos grasos *trans*. Hasta la década de los ochenta del siglo pasado no se intuía que la obtención de los

aceites vegetales parcialmente hidrogenados (PHVO) llevaba dentro de sí una auténtica “bomba de relojería”, y sólo se pensaba que la principal desventaja del proceso era la eliminación de ácidos grasos esenciales (EFAs).

La presencia de isómeros geométricos es una consecuencia inherente al mecanismo de hidrogenación de Horinti y Polanyi, que describe la adición reversible de los átomos de hidrógeno al doble enlace carbono-carbono en la superficie del catalizador. Después de la adición de un átomo de hidrógeno se forma un compuesto intermediario semi-hidrogenado (Figura 2).

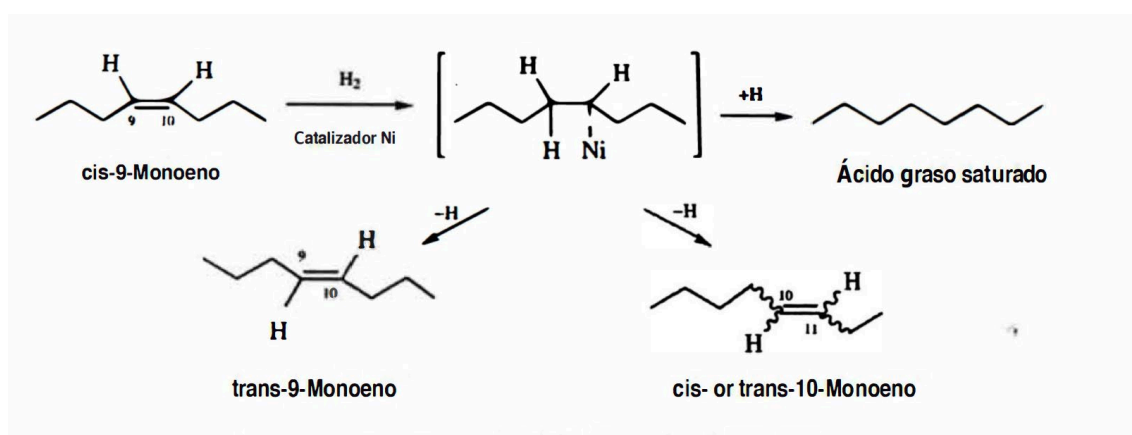


Fig. 2. *Vía alternativa en la hidrogenación de los aceites: formación de ácidos grasos trans.*

En este estado de transición puede ocurrir:

- Que se adicione otro átomo de hidrógeno para formar un ácido graso saturado;
- que se pierda un átomo de hidrógeno para reformular el doble enlace en una posición diferente,
- que se efectúe una rotación de 180 ° alrededor del enlace “sigma” y perder un átomo de hidrógeno para formar un ácido graso *trans*, reacción favorecida termodinámicamente.

Por tanto, los dobles enlaces pueden migrar a lo largo de toda la cadena hidrocarbonada y los ácidos grasos *trans* aumentaron durante los procesos de hidrogenación de los monoenos. Puesto que los aceites naturales contienen una mezcla de triacilgliceroles insaturados, el proceso de hidrogenación provoca la aparición de una

mezcla compleja de isómeros *cis* y *trans* (Allen, 1960; Allen & Kiess, 1955; Philippaerts *et al.*, 2013).

1.2 *Trans*-isomerización inducida por radicales libres

Se pueden generar ácidos grasos *trans* endógenamente a partir de los isómeros *cis* naturales mediante un proceso de isomerización geométrica inducido por radicales libres. Especialmente, activos son los radicales tiilo ($RS\cdot$) a través de un mecanismo de adición-eliminación. Estos radicales pueden inhibirse en presencia de retinoides, beta-caroteno, vitamina A, mientras que la vitamina E los secuestra débilmente (Tzeng & Hu, 2014; Samadi *et al.*, 2004).

Se hicieron ensayos con ratas *Wistar* jóvenes, que recibían una dieta con aceite de soja, pero exenta de ácidos grasos *trans*. El ácido graso *trans*-18:1 aparecía en fosfolípidos de membrana, y el *trans*-18:2 en eritrocitos y en tejido adiposo. El radical tiilo ($RS\cdot$) podía provenir del glutatión; residuos de cisteína o metaloproteínas. También la irradiación γ (gamma) (fuente: $^{60}\text{Cobalto}$), después de un flujo de N_2O originaba radicales hidroxilo ($\text{HO}\cdot$) que iniciaban la cadena de reacciones a partir de componentes con azufre (glutatión, cisteína...) para generar $RS\cdot$. En definitiva, tanto dicha irradiación como la peroxidación de las membranas celulares originaban, de forma endógena, un incremento notable de los niveles de ácidos grasos *trans* debido al extenso estrés radicalario (Zambonin *et al.*, 2006).

1.3 Uso y ventajas tecnológicas de los aceites parcialmente hidrogenados

Desde 1911, cuando Procter & Gamble introducen “Crisco”, un aceite de algodón hidrogenado, el uso de estos aceites no dejó de crecer. En 1930 se instaló la primera industria de vanaspati en Bombay. Este auge se aceleró a partir de 1960, en respuesta al consumo de grasas saturadas colesterolémicas. Baste decir que aún en 2007 se hidrogenaba la tercera parte de la producción de aceite de soja en Estados Unidos (Eckel *et al.*, 2007).

Es evidente que el uso de grasa hidrogenada era, desde el punto de vista técnico, ventajoso, pues se incrementaba la estabilidad y funcionalidad de los aceites, había amplia disponibilidad y el proceso era de bajo costo, en un principio. Se aumentaba la propiedad

crujiente de las galletas, mejoraba la aireación en los rellenos de pasteles, y la textura y plasticidad en bollería y, por sus puntos de fusión (de 13 °C a 44 °C), una deseada sensación gustativa (Kadhun & Schamma, 2017). Además, eran muy adecuados, por su estabilidad, como aceites de fritura inmersiva comerciales y en la fabricación de *dónuts* y similares. Además, e independientemente de la presencia de grasa *trans*, desde el punto de vista nutricional eran bastante negativas: los ácidos grasos saturados superaban el 40%, solo contenían alrededor del 5% de ácido linoleico, y menos del 0,5% del alfa-linolénico, además de presentar un alto índice aterogénico.

1.4 Ácidos grasos *trans* procedentes de rumiantes (R-TFA)

Los ácidos grasos *trans* pueden tener una fuente natural. En el rumen del estómago múltiple de los animales rumiantes (vaca, cabra u oveja) se produce un proceso de bio-hidrogenación provocado por ciertas bacterias, y esto conduce a la formación de ácido *trans*-vacénico (conocido simplemente como “ácido vacénico”) y ácidos linoleicos conjugados (CLAs) de entre los cuales destaca el ácido ruménico. Si el ácido eláidico era el *trans*-9-18:1, el ácido vacénico es el *trans*-11-18:2 (CLA) (de acuerdo con la nomenclatura de la IUPAC, que empieza a numerar por el carbono carboxílico).

El proceso de la bio-hidrogenación se expone en la Figura 3.

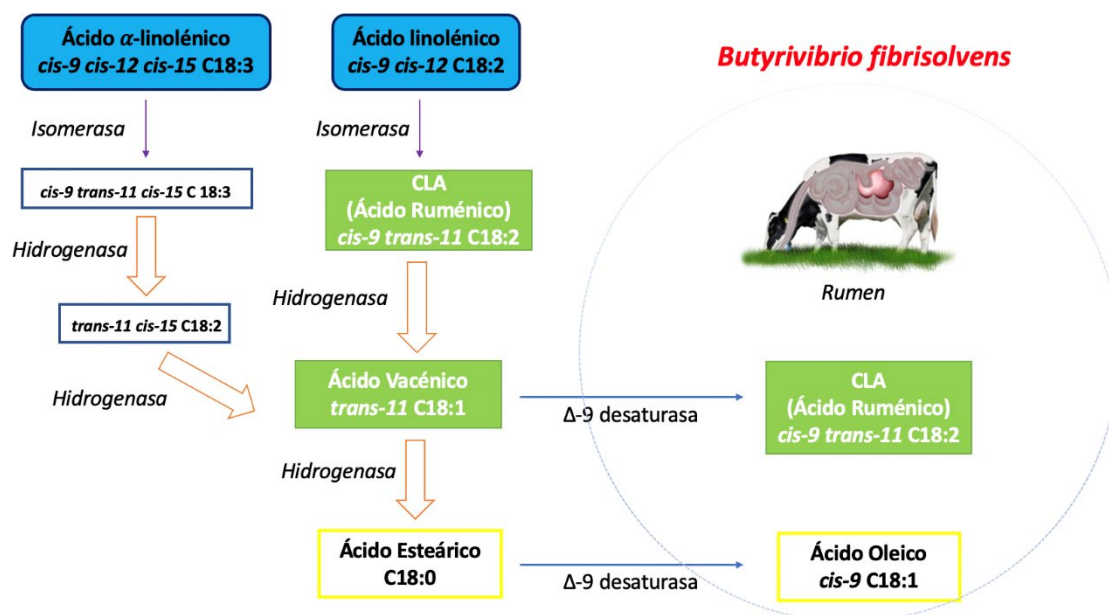


Fig. 3. Vías de transformación de los ácidos grasos insaturados de la dieta en los rumiantes.

Por acción de las isomerasas e hidrogenasas de las bacterias del rumen “*Propionibacterium acnes*” y “*Butyrivibrio fibrisolvens*” los ácidos PUFAs, que son tóxicos para las bacterias anaeróbicas, se transforman. El ácido linoleico se convierte en ácido ruménico (CLA) (en el rumen, por acción de una hidrogenasa, el ruménico pasa a vacénico); el ácido α -linolénico pasa a ácido vacénico, para luego, por acción de una $\Delta 9$ -desaturasa, transformarse hasta ácido ruménico en la glándula mamaria (Parodi, 2003; Bauman & Lock, 2006).

En la Figura 4 se ofrece la distribución de los isómeros *trans*-18:1 en leche y grasa vegetal parcialmente hidrogenada (EFSA, 2010; Schingfield *et al.*, 2008).

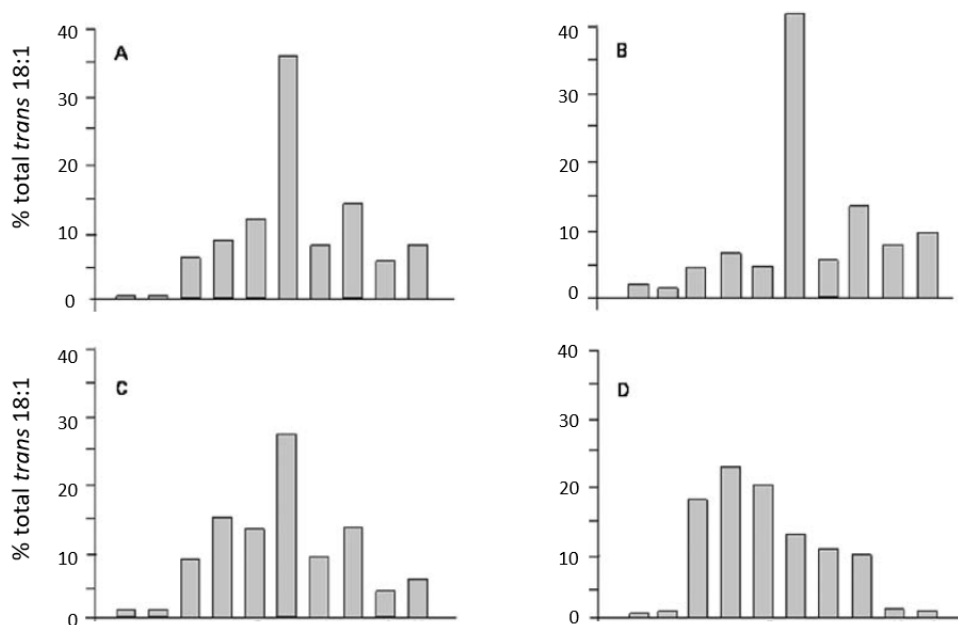


Fig. 4. Distribución de los isómeros *trans*-18:1 en grasa láctea de (A) cabra, (B) vaca, (C) mujer y (D) vegetal hidrogenado. El eje de abscisas muestra la posición de doble enlace en la cadena hidrocarbonada.

Se observa un gran predominio del ácido vacénico sobre los demás isómeros *trans*-18:1 en leche de vaca (sobre todo), y en leche de cabra. También destaca el ácido vacénico en leche de mujer, pero con una distribución gaussiana más achatada. Sin embargo, en los aceites hidrogenados se pierde esta distribución simétrica y es el ácido eláidico el que más sobresale. De cualquier forma, las cantidades relativas de los ácidos vacénico y eláidico van a depender de una serie de condiciones, como son:

- Tipo de alimentación del rumiante (pasto o piensos concentrados);
- pH en el rumen del animal;

- Niveles de PUFAs en el alimento del animal.

En este sentido las variaciones estacionales de los ácidos vacénicos y ruménico en la leche pueden ser manifiestas. Las hojas verdes y los pastizales suelen contener ácidos linoleico y linolénico; también están presentes en las semillas, salvo las del lino. Estos ácidos grasos insaturados son deficientes en los piensos compuestos, salvo que los suplementan (EFSA, 2004; Jahreis *et al.*, 1996). Resultan ilustrativos los datos de R-TFA en mantequilla según las estaciones del año (Tabla 1).

Tabla 1. *Contenidos estacionales de TFAs en mantequillas francesas (Morin, 2005).*

Estación	%TFA (sin CLA) ^a	% TFA (con CLA) ^a
Invierno	2,5	3,3
Primavera	3,0	
Verano	3,7	5,2

^a Porcentaje sobre 100 g de mantequilla.

Se ha discutido mucho sobre si los R-TFA, son iguales de nocivos que las de origen industrial (IP-TFA), fundamentalmente en su posible impacto sobre las enfermedades cardiovasculares (Pfeuffer & Schrezenmeir, 2006; Gebauer *et al.*, 2007; Jakobsen *et al.*, 2008; Weggemans *et al.*, 2004). En un ensayo controlado aleatorizado se pudo comprobar que cuando la ingesta de R-TFA fue elevada (por ejemplo, 10,2 g/p/d), el colesterol total sérico aumentó un 3% y las LDL-C aumentaron un 2%, que es la mitad de lo que se obtendría con una ingesta de 2,2 g/p/d de IP-TFA (grasa *trans* producida industrialmente, esto es, prácticamente PHVOs). En definitiva, se estimó que para ingestas de R-TFAs por encima de 3,4 g/p/d el efecto negativo sobre las enfermedades cardiovasculares sería similar al que causarían los IP-TFAs, aunque más agudas en estas últimas (Chardigny *et al.*, 2008). En general, en dietas normales los R-TFAs se suelen ingerir por debajo del 1E%, con lo que su impacto sobre la salud es limitado (Willett & Mozaffarian, 2008). No obstante, habría que proseguir con nuevos estudios para confirmar que los efectos diferenciales sobre la salud de estos dos tipos de grasa *trans*, procedentes de distintas fuentes, son sustancialmente desiguales (Brouwer *et al.*, 2013).

1.5 Ácidos linoleicos conjugados (CLAs)

Los ácidos linoleicos conjugados (CLAs) tienen su origen en la bio-hidrogenación y pueden sintetizarse en nuestro organismo por síntesis endógena, a partir de ácido vacénico. Asimismo, existe la posibilidad de que se formen en pequeña extensión al inicio del proceso de hidrogenación de aceites insaturados o durante una etapa de desodorización de aceites, especialmente cuando la temperatura supera los 250 °C, o incluso a temperaturas menores en el caso de aceites-PUFA (maíz, soja) (Destailats & Angers, 2005).

Prácticamente todos los CLAs presentan el doble enlace conjugado *trans* (los *cis* son minoritarios). La banda de absorción-infrarroja a 984 cm^{-1} ($10,2\ \mu\text{m}$) se observa (con una extinción específica inferior a la de los IP-TFA) debido a la vibración de deformación fuera del plano de los -CH- *trans*.

Los CLAs se encuentran predominantemente en un 70% en la leche y en un 25% en la carne, siendo el ácido ruménico (*cis* 9, *trans*-1 18:2) el 75-90% de los CLAs totales (Parodi, 2003). El ácido ruménico parece manifestar cierta actividad biológica positiva; por otro lado, el isómero *trans*-10, *cis*-12 18:2 es bastante nocivo, aunque, afortunadamente, sólo aparece en porcentajes inferiores al 1% sobre la grasa total de los alimentos (Park, 2009). Con una dieta mixta para el ganado, la presencia de CLA en leche se sitúa en un rango del 0,3-0,6%. Sin embargo, si la dieta se basa en pastizales, puede llegar al 1,1%, e incluso llegar al 5,17% si en la dieta del animal se incorpora aceite de girasol (Bauman & Lock, 2006).

Los CLAs tienen el potencial de ejercer efectos beneficiosos para la salud (Gómez Cortés *et al.*, 2018), pero no son todos los CLAs. Mientras que el isómero *trans*-10, *cis*-12 18:2 está asociado a procesos catabólicos, el ácido ruménico y su precursor, el ácido vacénico, pueden actuar como ligandos de los receptores activados por proliferadores peroxisómicos (receptores activados por proliferadores peroxisomales, PPAR), y presentar actividad anti-arterioesclerótica y anti-carcinogénica (Gómez Cortés *et al.*, 2018; Shokryzadan *et al.*, 2017). La mezcla equilibrada de ácido ruménico con el isómero *trans*-10, *cis*-12 18:2 se mostró útil frente a la adiposidad abdominal, sin mostrarse anomalía hepática, dado los bajos niveles de concentración de los isómeros mezclados (Whigham *et al.*, 2007).

1.6 Ingestas de grasa *trans*

Las ingestas poblacionales dependen de los hábitos de consumo, frecuencia de consumo y estratos de la población considerada. Se confeccionan a partir de datos representativos de los consumos promedio poblacionales en cada país, obtenidos a través de encuestas de consumo alimentario o de entrevistas. Es una tarea cara, laboriosa y limitada. Se consiguen datos primarios de los consumidores por medio de metodologías tales como:

- Recuerdo de 24 horas;
- Registros de 7 días;
- Cuestionarios de frecuencia (FFQ);
- Empleos de Tablas de Composición de Alimentos.

Estas tablas deberían ser preferentemente locales o nacionales. En España disponemos de las elaboradas por la Base de Datos Española de Composición de Alimentos (BEDCA) o las que editaba la profesora Moreiras y su grupo, del Departamento de Nutrición de la Universidad Complutense. Si se carece de dichas tablas o se dispone de tablas incompletas, se podría acudir a tablas generalistas, que se van renovando periódicamente. Las más recomendadas son las británicas de Widdenson & McCance (“The Composition of Foods”), o las de la USDA (Departamento de Agricultura de Estados Unidos). Lo ideal sería poder disponer de fuentes directas concretas, a través de un trabajo de investigación reciente, ya que dentro de cada grupo de alimentos puede existir una amplia variabilidad.

Asimismo, se podrían emplear ecuaciones empíricas que establezcan relaciones entre las concentraciones biológicas de los TFAs y las ingestas de grasa *trans* mediante bio-marcadores (tejido adiposo, plasma, membranas de eritrocitos, leche materna). Aunque esta metodología sería más representativa, su implementación resulta más costosa y compleja. Es innegable que evaluar las consecuencias clínicas a largo plazo de un consumo habitual de grasa *trans*, bajo condiciones dietéticas totalmente controladas, no ha sido factible debido a las limitaciones éticas que esto conlleva.

Globalmente, con el transcurso de los años (sobre todo a partir del año 2000) se han ido reduciendo las ingestas de grasa *trans*, al menos en los países más desarrollados y con legislaciones más contundentes (Micha *et al.*, 2014). Aun así, habría que emprender

Capítulo 1

Introducción: Definiciones y conceptos, ingestas poblacionales, efectos sobre la salud, determinación de grasa trans en productos alimentarios

políticas para tratar de reducir las ingestas de grasa *trans* en las franjas poblacionales más desfavorecidas, también en los países más desarrollados (Allen *et al.*, 2015).

Como el 75-80% del TFA ingerido pasa a tejido adiposo humano, dicho tejido es un bio-marcador bastante representativo de las ingestas de grasa *trans*. Se puede calcular mediante la Ecuación de Enig (Ecuación 1) (Enig *et al.*, 1990),

$$y=0,97 + 0,44x \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde:

x = porcentaje (%) de TFA en tejido adiposo;

y = porcentaje (%) de TFA en la dieta.

Se puede conocer las ingestas de TFA conociendo el %TFA, sobre grasa total, en el tejido adiposo, aplicando la técnica analítica (cromatografía de gases, espectroscopía infrarroja), después de conseguir la muestra de la persona mediante una biopsia abdominal (Boué *et al.*, 2000).

De los datos de la Tabla 2 se desprende la brecha existente entre las poblaciones de los países anglosajones, con mayor ingesta de grasa *trans*, y los países mediterráneos. España presenta el valor más bajo de la Tabla.

Tabla 2. Porcentajes de TFA, sobre grasa total, en tejido adiposo en las poblaciones de distintos países (Combe *et al.*, 1998).

País	% TFA en tejido adiposo
Canadá	4,8
EEUU	3,2
Reino Unido	3,0
Francia	1,8
Grecia	1,2
España	0,6

Capítulo 1

Introducción: Definiciones y conceptos, ingestas poblacionales, efectos sobre la salud, determinación de grasa trans en productos alimentarios

En las madres lactantes el contenido de grasa *trans* en la leche materna refleja fehacientemente la ingesta del día anterior al de la medida (Boatella *et al.*, 1993). Se sabe que a través de la leche en la lactancia se trasladan al bebé grasa *trans* lo que puede perjudicar su desarrollo y el del sistema nervioso central. En la Unión Europea sólo están regulados los preparados para lactantes y de continuación mediante una Directiva en la que se establece que “el contenido de ácidos grasos *trans* no será superior al 3%, sobre el total de materia grasa del producto” (CEE, 2006).

En la Tabla 3 se recoge la evolución con los años del consumo de grasa *trans* de algunos países representativos.

Tabla 3. *Evaluación de las ingestas de grasa trans en distintos países.*

País	Año	Ingesta de TFA (g/p/d)	Referencia
EEUU	1980s	7-12,8	Hunter & Applewhite, 1991
	1990s	5,3	Borra <i>et al.</i> , 2007
	2003	4,0-6,4	Hunter, 2006
	2010	1,3	Doell <i>et al.</i> , 2012
Canadá	1980s	8-12	Aro <i>et al.</i> , 1995
	1990s	8,4	Ratnayake <i>et al.</i> , 2009
	2006	2,2-3,4	Ratnayake <i>et al.</i> , 2009
Dinamarca	1980s	6-17	Aro <i>et al.</i> , 1995
	1991	5,0	Stender & Dyerberg, 2004
	1997	2,7	Stender & Dyerberg, 2004
Reino Unido	1980s	7	Sanders, 1988
	1990s	2,8	Hulshof <i>et al.</i> , 1999
	2003	3,0 (H)* 2,1 (M)*	Laloux <i>et al.</i> , 2007

Capítulo 1

Introducción: Definiciones y conceptos, ingestas poblacionales, efectos sobre la salud, determinación de grasa trans en productos alimentarios

País	Año	Ingesta de TFA (g/p/d)	Referencia
Alemania	1980s	5-6,5	Aro <i>et al.</i> , 1995
	1990s	3,7	Steinhart & Pfalzgraf, 1995/1996
Países Bajos	1980s	10	Spaaij & Pijls, 2004
	1990s	4,3	Health Council of the Netherlands, 2006
Noruega	1980s	7,1	Aro <i>et al.</i> , 1995
	1990s	4,0	van Poppel <i>et al.</i> , 1998
	2010	2-4	Wanders <i>et al.</i> , 2017
Suecia	2010	0,7	Wanders <i>et al.</i> , 2017
Islandia	1990s	5,4	Hulshof <i>et al.</i> , 1999
	2010	2,4	Wanders <i>et al.</i> , 2017
Francia	1980s	5-6,5	Aro <i>et al.</i> , 1995
	1990s	2,3	Hulshof <i>et al.</i> , 1999
	2003	2,7-3,3	Léger <i>et al.</i> , 2007
Italia	1980s	2-3,5	Boatella <i>et al.</i> , 1993
	1997	1,6	Pizzoferrato <i>et al.</i> , 1999
Grecia	1990s	1,4	van Poppel <i>et al.</i> , 1998
Portugal	1990s	1,6	van Poppel <i>et al.</i> , 1998
España	1980s	2-3	Boatella <i>et al.</i> , 1993
	1990s	2,4	Parcerisa <i>et al.</i> , 1999
	2001	2,05	Capita & Alonso-Calleja, 2003
	2010	0,78	Papantoniou <i>et al.</i> , 2010
Polonia	1990s	3,3-6,9	Zbikowska, 2010

Capítulo 1

Introducción: Definiciones y conceptos, ingestas poblaciones, efectos sobre la salud, determinación de grasa trans en productos alimentarios

País	Año	Ingesta de TFA (g/p/d)	Referencia
Japón	1990s	1,56	Okamoto <i>et al.</i> , 1999 Zhou <i>et al.</i> , 2003
	2007	1,8	Yamada <i>et al.</i> , 2010
China	1990s	0,4	Zhou <i>et al.</i> , 2003
Corea del Sur	1990s	0,6	Craig-Schmidt, 2006
Irán	2010	9,3	Wanders <i>et al.</i> , 2017
Brasil	2008	2,4	Wanders <i>et al.</i> , 2017
Costa Rica	2006	2,9	Wanders <i>et al.</i> , 2017
Sudáfrica	1990s	1,5	MacIntyre <i>et al.</i> , 2002
Oriente Medio	2010	5,3	Wilczek <i>et al.</i> , 2017

*H=Hombres; M=Mujeres.

En líneas generales, las ingestas descendieron conforme se introducían las reformulaciones en dichos países a partir de los años noventa. El descenso ha sido significativo en Norteamérica y Centroeuropa. En los países mediterráneos se mantuvieron siempre ingestas menores. Es de destacar las muy bajas ingestas en países asiáticos orientales, como Japón, Corea del Sur y China. En América Latina también se ha trabajado para rebajar las ingestas de grasa *trans*. En cambio, en Europa del Este (Polonia), Irán y Oriente Medio las ingestas eran más altas. En España, las ingestas de grasa *trans* siempre han sido bajas.

En los Estados Unidos, del 2003 al 2010 se produjo un descenso notable de la ingesta de grasa *trans*, que alcanzó el 72%. En este país, en 2004, todavía eran sustanciales las ingestas debido al consumo de margarinas duras, *dónuts*, bollería, pre-congelados y palomitas de maíz. Canadá figuraba en las décadas de 1980s y 1990s a la cabeza de las ingestas en grasas *trans*: más de un 10% se ingerían con las margarinas no reformuladas, contando también el consumo de bollería y pastelería industrial y productos y *snacks* de comida rápida. La grasa *trans* que se ingería en este país suponía hasta el 10%

Capítulo 1

Introducción: Definiciones y conceptos, ingestas poblacionales, efectos sobre la salud, determinación de grasa trans en productos alimentarios

de la grasa total ingerida, alcanzándose cifras impensables, de hasta 38 g/p/d. Como el 90% de la grasa *trans* se presenta como “grasa invisible”, se dieron casos de un consumo indebido en embarazadas canadienses, lo que repercutió negativamente en el normal desarrollo del feto (Elias & Innis, 2002).

Dinamarca presentó un descenso sostenible de grasa *trans* entre 1991 y 1996, lo que se apreció en la salud cardiovascular de la población (Leth *et al.*, 2006). En algunos países como en Alemania, Francia y España, la ingesta de grasas *trans* era mayor en hombres que en mujeres mientras que en otros, como Japón, las mayores ingestas se producían en mujeres de mediana edad. En los Países Bajos, el 25% de la ingesta de TFA provenía del consumo de galletas, bollería y repostería, y un 9% de fritos y *snacks*.

En Suecia, en cambio, el nivel de ingestas era sólo del 0,3 E% y la bollería, pastelería y helados sólo contribuían a la ingesta de grasa *trans* en un 7%. En Francia, donde la Agencia de Seguridad Alimentaria (AFSSA) acoge también dentro del concepto de ácidos grasos *trans* a los que provienen de leche (lácteos) y carne de rumiantes, casi el 50% procedía de la mantequilla y los quesos (Laloux *et al.*, 2007).

En 2001, alrededor del 97% de la población española se situaba dentro de los niveles de ingesta considerados aceptables (menos de 2 E%, o sea, menos de 4,2 g/p/d) (Capita & Alonso-Calleja, 2003). Pero si tenemos en cuenta el estudio de la población del Noreste mediterráneo, se hallaron ingestas por debajo del 1 E%, establecido por la OMS, y significativamente diferentes ($p < 0,01$) entre hombres (0,78 E%) y mujeres (0,47 E%) (Papantoniou *et al.*, 2010). Por su parte, en las mujeres japonesas urbanas de mediana edad (frente al grupo equivalente rural) las ingestas de grasa *trans* podían superar el 1 E%; casi el 40 % de estas ingestas procedían del consumo excesivo de productos de panadería, bollería, y confitería (Yamada *et al.*, 2010). Por el contrario, en el caso de Brasil, las ingestas eran más altas en los adolescentes, sobre todo en los varones (Remig *et al.*, 2010).

1.6.1 El Estudio TRANSFAIR

En 1995, la Comisión Europea financió el proyecto “TRANSFAIR Study: Intake of fatty acids in Western Europe with emphasis on *trans* fatty acids”. TRANSFAIR es un acrónimo formado a partir de “*trans* fatty acid intake acid risk” (Ingestas de TFAs y factores de riesgo para la enfermedad cardiovascular en Europa). Participaron 14 países de Europa Occidental, entre ellos, España. Se confeccionó una dieta tipo para cada país, se hizo una combinación de los componentes, y se centralizaron todos los análisis en un mismo laboratorio (Países Bajos). Luego se determinaron las ingestas medias en cada país participante expresando los resultados en gramos de TFA por persona y día (g/p/d).

España y los países mediterráneos (que suelen cocinar con aceite de oliva) presentaron ingestas por debajo del 1 E% (OMS). Alemania, Reino Unido y Dinamarca estaban en el límite, y Francia lo sobrepasaba un poco. Los países escandinavos y los Países Bajos presentaban las mayores ingestas. Esto se debía a que en los países del Centro y del Norte de Europa solían utilizar en cocina, mantequilla y margarina (Hulshof *et al.*, 1999, van Poppel *et al.*, 1998).

Como se observa en la Tabla 4, la FAO/WHO y la Asociación Americana del Corazón (AHA) recomiendan no sobrepasar las ingestas de grasa *trans* del 1 E%. El mismo criterio siguieron Alemania, Austria, Países Bajos, y Suiza. En cambio, otros países fueron más permisivos y las limitaron al 2 E% (Canadá, Reino Unido y Francia). En España se adoptó una posición ecléctica, la misma que adoptó en principio la Comunidad Europea, recomendando unas ingestas tan bajas como fueron posible, manteniendo el valor nutricional adecuado de la dieta.

Tabla 4. Límites máximos recomendados de ingesta de grasa trans.

País/Organización	Límite de ingesta de TFA recomendado	Referencia
Canadá	2 E%	EFSA, 2010
Alemania, Austria	1 E%	EFSA, 2010
Países Bajos	1 E%	Spaaij & Pijls, 2004
Reino Unido	2 E%	EFSA, 2010
Suiza	1 E%	EFSA, 2010
Francia	2 E%	EFSA, 2010
Reino Unido, países escandinavos	10 E% (suma SFA+TFA)	EFSA, 2010
AESAN ^a	tan bajo como sea posible	AESAN, 2010
AHA ^b , ADA ^c	1 E%	Kris-Etherton & Innis, 2007
FAO/WHO	1 E%	FAO/WHO, 2010

^a AESAN: Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición;

^b AHA: *American Heart Association*;

^c ADA: *American Dietetic Association*.

La casuística en India y Pakistán preocupa mucho y afecta a la consecución de los objetivos de la OMS a corto plazo. En estos países y en algunos otros de la zona, es frecuente cocinar con aceites hidrogenados tanto en restaurantes como a nivel doméstico. Se tratan del “ghee” y el “vanaspati”. El “ghee” es una grasa de mantequilla obtenida mediante calentamiento, y separación de la fase acuosa. Se confecciona a partir de la leche de vaca, búfala, cabra u oveja. Es más resistente al enranciamiento que la mantequilla normal.

Por su parte, el vanaspati es un aceite vegetal hidrogenado, purificado, y fortificado con vitaminas A y D; es el sucedáneo vegetal del “ghee”. El vanaspati se confecciona a partir de aceites tropicales (de palma, palmiste, y coco) importados, que se hidrogenan parcialmente. Presenta un contenido de grasa *trans* muy variable (0,6-30 %TFA), pero sólo el 7 % ofrece valores inferiores al 2 %TFA. Además, presenta un alto índice

Capítulo 1

Introducción: Definiciones y conceptos, ingestas poblacionales, efectos sobre la salud, determinación de grasa trans en productos alimentarios

aterogénico, pues la suma de ácidos grasos saturados más ácidos grasos *trans* es superior al 60 % (se recomienda que no sobrepase el 40 %) (Nigam, 2000). La tolerancia gubernamental y la ignorancia ciudadana inciden en un elevado consumo de vanaspati y aceites hidrogenados, tanto procedentes de frituras de abuso, como de la venta callejera de productos populares en dichos países como las “samosa” o los “paratha” y esto ha contribuido a la propagación de enfermedades cardiovasculares, incluso de diabetes (Butt & Sultan, 2009). Las autoridades gubernamentales, a través de una ley de seguridad alimentaria, establecieron una limitación del 10 %TFA para los vanaspati y otros aceites hidrogenados (FSSAI, 2010). Pero la realidad era que en algunas muestras de vanaspati analizadas se superaba de 1,3 a 2,5 veces lo legislado y se encontraron en algunos casos valores muy altos, de hasta el 30 %TFA. El consumo medio de estos aceites vegetales hidrogenados por la población india es de 1,60 g/p/d, lo que sumaba a los 0,60 g/p/d de TFA procedente del vanaspati, existiendo regiones al norte del país, como la del Punjab, con consumos extremos descontrolados de 15 g/p/d, y una mayor tasa de mortalidad de origen cardiovascular (Dixit & Das, 2012).

Pakistán, al igual que la India, presenta ingestas excesivas de grasa *trans*. De acuerdo con el desafío de la OMS para 2023, se realizaron esfuerzos para eliminar los ácidos grasos *trans* de origen industrial (IP-TFA). Junto al vanaspati, las mayores fuentes de grasas hidrogenadas (PHVOs) han sido las grasas anhidras y concretas (“shortenings”) para uso en bollería, pastelería, margarinas duras, y otras grasas untables. Se constata que todavía la legislación en este país resulta insuficiente y se recomendó reemplazar el vanaspati con alternativas más sanas, implementar mayores prácticas reguladoras, y enmendar las leyes del etiquetado (Tarar *et al.*, 2020).

Los países del Este de Europa hace largo tiempo que presentan altos contenidos de grasa *trans* en sus suministros de alimentos. De un estudio comparativo europeo basado en la “cesta de la compra” se desprendía, por ejemplo, que una misma comida formal constituida por patatas fritas, galletas y palomitas de maíz aportaba menos de 2 gramos de TFA en Francia, Alemania y Reino Unido, mientras que, por el contrario, aportaba 10-20 g de TFA en Polonia, Hungría o Rumanía (Stender *et al.*, 2012).

En Repúblicas ex-soviéticas (Georgia, Kazakhstan, Armenia) o ex-yugoslavas (Serbia, Croacia) se han encontrado recientemente en supermercados entre 50 y 100 productos alimentarios con más de 2 %TFA (sobre grasa total) dándose el caso en algunos

Capítulo 1

Introducción: Definiciones y conceptos, ingestas poblacionales, efectos sobre la salud, determinación de grasa trans en productos alimentarios

de alcanzar cifras de 50 %TFA (Stender, 2020). En 15 países ex-soviéticos se encontraron contenidos que iban del 14 %TFA al 21 %TFA (sobre grasa total) declarando en el etiquetado explícitamente la presencia entre los ingredientes de grasas hidrogenadas, o bien, términos como “contiene margarina dura” o “grasas de confitería” (Stender, 2019). En pasteles domésticos de venta callejera en Bosnia-Herzegovina se detectaron contenidos de 2,3 g TFA por ración, además de un exceso de grasa total y de grasa saturada, lo que reclamaría entornos de venta callejera más controlados (Albuquerque *et al.*, 2022). Otra zona geográfica donde existen lagunas legislativas sobre la grasa *trans* es el Norte de África. Entre los productos más consumidos en el mercado egipcio, el 34 % excedían el 2 %TFA, sobre grasa total, y entre las de mayor carga *trans* se situaban los dulces orientales, los alimentos de comida rápida, y las frituras con aceites usados (aceites de abuso) (Ismail, 2021).

Para finalizar el epígrafe de ingestas de grasa *trans* se comentan algunas limitaciones. Por ejemplo, el uso de distintas metodologías para evaluar las ingestas. Así, casi por la misma época, finales de los 1990s, en el caso de España (0,7 E%) se empleó el registro doméstico de 7 días (Hulshof *et al.*, 1999), los sudafricanos (0,7 E%) usaron un cuestionario de frecuencias (FFQ) (MacIntyre *et al.*, 2002), mientras que en China (0,2 E%) se empleó el recuerdo de 24 horas (Zhou *et al.*, 2003). También puede aparecer heterogeneidad por las diferentes formas de muestreo.

La cuestión de las bases de datos es otro punto a tener en cuenta. No todas las tablas de composición de alimentos son locales o nacionales, ni todos poseen datos de TFAs. Además, los alimentos varían dentro de un mismo grupo de alimentos, varían su composición entre los países, o entre las cosechas, también los procesamientos difieren o las alternativas tecnológicas. Muchos países como Suecia, Japón, o los países mediterráneos, con ingestas de grasa *trans* inferiores al 1 E% no priorizan la evaluación de nuevos estudios de ingesta. A veces se dice “TFA de origen animal” mal expresado; debe consignarse TFA procedente de leche y carne de animales rumiantes. Aunque la ingesta de TFA de un país sea baja, pueden existir subgrupos poblacionales con ingestas más elevadas, como los adolescentes o los de menores ingresos (Stender *et al.*, 2016).

1.7 Ácidos grasos *trans* y perfil lipídico

Hubo un momento trascendental en la historia de la grasa *trans*. Esto sucedió cuando Mensink y Katan (1990) publicaron un artículo pionero para comprender la relación con la salud de los ácidos grasos *trans*. Su investigación, basada en ensayos aleatorizados controlados, descubrió que los ácidos grasos *trans* elevaban en plasma el colesterol total y las lipoproteínas LDL-C, a la vez que rebajaban las HDL-C (Katan, 1995). Por efecto del TFA las pequeñas partículas LDL-C se convierten en partículas más grandes y homogéneas (aumentan el tamaño en 2,44 armstrong) que afectan al sistema cardiovascular (Kim & Campos, 2003). El descenso de las lipoproteínas HDL-C se debe a la estimulación de la actividad de la lipoproteína de transferencia del éster de colesterilo, que transfiere los ésteres de colesterol desde las HDL-C hasta las LDL-C y las VLDL-C (Abbey & Nestel, 1994). Asimismo, en presencia de TFA disminuye la actividad del receptor hepático de LDL-C, por lo que aumentan los niveles séricos de esta lipoproteína (Woollett *et al.*, 1994). Los ácidos grasos *trans* elevan también los niveles séricos de lipoproteínas (a) [Lp(a)]. Lo normal es que los valores sanguíneos de esta lipoproteína estén por debajo de 150 mg/L y no suelen cambiar, puesto que están bajo control genético; si se supera el citado valor sería un factor de riesgo para la incidencia de infarto de miocardio (Mensink *et al.*, 1992).

Comparativamente, la grasa *trans* puede ser más perjudicial para el perfil lipídico que la grasa saturada. Se produce una ratio en suero colesterol total/HDL-C duplicada en el caso de los ácidos grasos *trans*, con respecto a las saturadas (Ascherio *et al.*, 1999). En el transcurso del “Nurses Health Study” (“Estudio de las Enfermeras”), en Estados Unidos, se pudo comprobar que un aumento del 2 E% de ingesta de TFA suponía un 23% de riesgo extra cardiovascular, mientras que un aumento del 5 E% de ingesta de grasa saturada podía ocasionar un 17 % de riesgo aumentado cardiovascular (Hu *et al.*, 1997). Se producía además un aumento del catabolismo de HDL-apoA-I y un descenso del catabolismo de LDL-apoB-100, datos que se confirmaron en mujeres hipercolesterolémicas; estos cambios daban lugar a ratios colesterol total/HDL-C y LDL-C/HDL-C menos favorables en el caso de los TFAs que en el de los ácidos grasos saturados (Matthan *et al.*, 2004). La asociación entre TFA y colesterol está más contenida en Japón. Esto se debe a que en la dieta de los japoneses existe una ratio PUFA/SFA=2:1,

frente a la ratio PUFA/SFA=1:1 de la dieta de los países occidentales: es el “efecto linoleico” que contrarresta el efecto nocivo de los TFAs (Takeuchi & Sugano, 2017).

1.8 Efectos de la grasa *trans* sobre la salud

Los ácidos grasos *trans* son más deletéreos que los demás ácidos grasos de la dieta, en especial, para el sistema cardiovascular (Kromhout *et al.*, 2011). Existen pruebas suficientes que confirman que su nocividad supera a la de la grasa saturada (Oomen *et al.*, 2001). Tanto la dieta mediterránea (rica en legumbres, frutas y verduras, frutos secos, aceite de oliva) como la japonesa de Okinawa (rica en pescado, arroz y algas) presentan menores porcentajes de grasa saturada y de grasa *trans*, siendo recomendable mantener ambos bajos para una buena salud cardiovascular (Mozaffarian & Ludwig, 2010).

Una serie de factores y circunstancias afectan al grado de nocividad de la grasa *trans*. Así, entre otros:

- Cantidad ingerida (se recomienda no sobrepasar 2 g/p/d, o bien, 1 E%);
- Cantidad absorbida (si se consume fibra dietética se reducirá la absorción; por lo tanto, es conveniente estimular el consumo de frutas y verduras) (Enríquez *et al.*, 2003);
- Tipo de TFA (las de origen industrial son más nocivos, que las de origen natural) a igualdad de concentración; los *di-trans* son especialmente nocivos; los aceites de pescado parcialmente hidrogenados son más nocivos que los aceites vegetales parcialmente hidrogenados (Müller *et al.*, 2001);
- Las formas oxidadas de los TFAs se metabolizan con mayor dificultad, de ahí que convenga una dieta anti-oxidante (tomate, zanahoria, frutas del bosque);
- Las personas obesas son más sensibles a ingestas iguales de TFA, máxime si llevan asociadas el síndrome metabólico (Risérus *et al.*, 2002).

Además de ser muy representativo de las ingestas grasas, siempre es preferible elegir el tejido adiposo como bio-marcador en los estudios a largo plazo dado que sus recambios son lentos. En personas con obesidad mórbida detectaron mayores niveles de grasas *trans* en la grasa visceral después de una cirugía bariátrica, lo que resultaba preocupante por una mayor lipólisis, importante indicador de alteraciones metabólicas (Bortolotto *et al.*, 2005).

Los primeros estudios se llevaron a cabo en animales de experimentación (ratas). En ratas que recibían dietas con TFA-sintéticos (trielaidina), ésta se metabolizaba en un 90 %, 10 % se acumulaba en el tejido adiposo, y sólo un 1 % aparecía en heces. Se producían retrasos en el crecimiento de los animales, emaciación, hipertrofia del hígado, y disminución de la eficacia lipídica (incremento del peso/peso de los lípidos ingeridos) (Allen, 1960; Raulin, 1960). En material de autopsia humana se comprobó que los ácidos grasos *trans* de cadena larga podían ser metabolizados tan fácilmente a como lo eran los *cis* ; los análisis informaron que el tejido adiposo contenía entre 2,4 y 12,2 %, y los ateromas de personas que habían fallecido por aterosclerosis, entre un 2,3 y un 8,8 % de TFA (Johnston *et al.*, 1957).

Una vez que se absorben, los ácidos grasos *trans* se incorporan a los fosfolípidos de membranas celulares, afectando la permeabilidad y funcionalidad de éstas, y distorsionando las funciones de los receptores de membrana (Woollett *et al.*, 1994). Las moléculas de TFAs pueden actuar como ligando de los receptores internos, regulando la transcripción genética (Vanden Heuvel, 2004), y provocar un descenso de la actividad del receptor hepático de las partículas LDL-C. También bloquean la Δ G-desaturasa, alterando, de forma competitiva, la vía metabólica que, partiendo de los ácidos grasos esenciales (EFAs) debe desembocar en las prostaglandinas antitrombóticas PG₁ y PG₃ (Beare-Rogers, 1983; Kinsella *et al.*, 1981). La enzima COX-2 reconoce los TFAs, como sustratos extraños, y reacciona con ellos, originando inflamación e inhibición de la prostaciclina, necesaria para prevenir la formación de coágulos en las arterias (Kummerow, 2009).

La relación directa entre ingestas de grasa *trans* y riesgo cardiovascular resulta cuantitativamente mayor que la que se podría predecir teniendo en cuenta únicamente su efecto adverso sobre el perfil lipídico. Se ha comprobado una estimulación de la transcripción del factor nuclear NF-kappa B, que desencadena la producción de biomarcadores de la inflamación sistémica (IL-6, TNF- α , CRP, selectina) (Martínez Martín & dePablos Velasco, 2007; Mozaffarian *et al.*, 2004b). La función endotelial también se ve afectada, a través de una desregulación de la dilatación arterial (Mozaffarian, 2006a; López-García *et al.*, 2005).

1.8.1. Cardiovascular

Sin lugar a duda, la mayoría de las investigaciones se han centrado en la asociación causal entre ingestas de grasa *trans* y las cardiopatías, que se va a comentar seguidamente. El otro campo de exploración ha sido comprobar si existía una relación entre las ingestas de grasa *trans* y la incidencia de ciertos tipos de cáncer (mama, colon, próstata). Esto último se comentará en el último capítulo de esta Tesis.

Dentro de los estudios de cohorte prospectivos se obtuvieron riesgos relativos (RR), respecto a la enfermedad cardíaca coronaria de alrededor del 30 % en los estudios americanos con amplio seguimiento (10-20 años). Es el caso del “Nurses’ Health Study” (RR=1,33), “Health Professionals Follow-up Study” (RR=1,26), y “Zutphen Elderly Study” (RR=1,28). En los estudios caso-control, el principal fue el estudio europeo EURAMIC, donde, en principio, el riesgo relativo fue neutro (RR=0,97); sin embargo, si se exceptuaba el caso español (la cohorte española originaba dilución de datos, al ser muy bajo el riesgo cardiovascular), RR (intercuartil)=3,1, significativo. En los ensayos clínicos, cuando la ingesta de grasa *trans* era descontrolada, aumentaban los niveles circulantes de bio-marcadores de la inflamación (Nestel, 2014).

En un meta-análisis de cohorte prospectivo se demostró que un aumento del 2 E% de TFA reemplazando iso-calóricamente a carbohidratos estaba asociado a un aumento del 24% del riesgo de enfermedad cardíaca coronaria (Mozaffarian *et al.*, 2006b). Por último, hay que tener en cuenta que, en condiciones óptimas de salud, el óxido nítrico endotelial promueve la vasodilatación y previene la agregación plaquetaria. Pero la presencia de ácidos grasos *trans* en la membrana del endotelio vascular activa la NADPH-oxidasa, se liberan radicales libres oxidantes y se reduce la producción de óxido nítrico, resintiéndose la función vasodilatadora (Iwata *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2019).

1.8.2 Tipo de fuente

Hay una cuestión que ha trascendido durante varios años, y aún no está del todo resuelta: ¿Son los R-TFA igual de nocivos que los IP-TFA? El ácido vacénico se metaboliza más rápido que el ácido eláidico. En el “Nurses’ Health Study” el ácido vacénico parece cardiovascularmente beneficioso, pero los resultados no son significativos. En el estudio de Aquitonia, en hospitales franceses, se concluía que el nivel

Capítulo 1

Introducción: Definiciones y conceptos, ingestas poblacionales, efectos sobre la salud, determinación de grasa trans en productos alimentarios

umbral para muestras nocivas era 1,3 E% - 3 E% de TFA total. Si el nivel era 1,2 E%, prácticamente no había riesgo cardiovascular (RR=1,15). Si el nivel era elevado, ya sea de IP-TFA como de R-TFA, afectaba al riesgo cardíaco. ¿Son más peligrosos los *trans*-MUFA que los *trans*-PUFA? Los *trans*-PUFA son más nocivos, afortunadamente, se suelen encontrar en cantidades inferiores al 1-2% sobre grasa total. En personas que habían sufrido paro cardíaco se encontraron niveles estimables de *trans*-18:2 en los glóbulos rojos, comparando con controles sanos, y una elevada concentración *trans*-18:2 en los fosfolípidos de membranas de eritrocitos que puede aumentar el riesgo de infarto de miocardio (Weggemans *et al.*, 2004).

En un ensayo controlado aleatorizado doble-ciego (Gebauer *et al.*, 2015) se comprobó que los resultados obtenidos de aumento del colesterol total sérico y los LDL-C después de ingerir 3 E% de ácido vacénico se correlacionaban con los obtenidos por Motard-Bélanger *et al.*, (2008), después de administrar una dieta con mantequilla enriquecida (3,7 E% de R-TFA), comparado con una dieta control baja en TFA (0,8 E%). Parece evidenciarse que no deberían ser preocupantes ingestas moderadas de R-TFA, pero cuando son más altos (mayor que 3 E%) ya originan los mismos efectos adversos aterogénicos que los TFAs de origen industrial.

Pero ¿cuál es la ingesta real de R-TFA en la dieta usual? En el caso de que una persona consumiera toda su grasa saturada recomendada a partir de R-TFA sería una ingesta de 10 E%, pero que se correspondería con una ingesta de 20 E% R-TFA (ya que las grasas de rumiantes suponen el 50 % de la grasa saturada ingerida). Como el contenido promedio de TFA de leche (lácteos) y carne de rumiantes es en promedio el 5%, entonces el 5% del 20 E% son 1 E%, o menos de R-TFA lo que, en definitiva, consumía una persona en una dieta recomendada usual. Esto es bastante menos que 3,7 E%, incluso, menos que 1,5 E%, y esto puede tranquilizarnos (Willett & Mozaffarian, 2008).

Ghavami *et al.*, (2012) fueron los primeros en examinar los efectos de los ácidos grasos *trans* sobre los mecanismos de muerte celular (apoptosis, autofagia) en miofibroblastos ventriculares primarios. Comparando en un ensayo los ácidos oleicos (control), eláidico y vacénico, en el caso del ácido eláidico (que representa los IP-TFA), tanto respecto al control como respecto al ácido vacénico, aparecía un aumento significativo ($p < 0,05$) de los marcadores apoptóticos. En el caso del ácido vacénico no es significativo el aumento pequeño que aparece (Ganguly & Pierce, 2015). En una

Capítulo 1

Introducción: Definiciones y conceptos, ingestas poblaciones, efectos sobre la salud, determinación de grasa trans en productos alimentarios

población de pacientes con cardiopatías diversas se determinaron los TFAs en plasma y en eritrocitos, y luego se representaron frente a la conocida como puntuación Gensini, que mide la severidad de la enfermedad arterial coronaria en función del estrechamiento del lumen de la arteria. Se observó cómo al aumentar los niveles de ácidos grasos *trans* en sangre aumentaba significativamente ($p < 0,001$) la puntuación Gensini, es decir, las lesiones ateroscleróticas (Hadj Ahmed *et al.*, 2018).

1.8.3 Diabetes tipo-2

Muchos de los estudios emprendidos fueron de corta duración (apenas de 1 mes) y otros tantos resultados fueron contradictorios (Aronis *et al.*, 2012). Una ingesta excesiva de grasa *trans* influía en el nivel de resistencia insulínica, por afectación de los receptores insulínicos de las membranas (Hu *et al.*, 2001). Un incremento de 2 E% de TFA en mujeres de mediana edad se asociaba con una incidencia 1,39 veces mayor de diabetes (Salmerón *et al.*, 2001). Se han observado efectos nocivos sobre la insulinemia post-pandrial en el caso de diabéticos obesos con ingestas frecuentes de grasa *trans* (Risérus, 2008).

La grasa *trans* puede influir sobre la transcripción genética modulando receptores nucleares (PPAR) y el receptor X hepático, que desempeñan papeles clave en el metabolismo de la glucosa (Saravanan *et al.*, 2005). Estudios más recientes han encontrado asociación directa significativa entre la concentración plasmática de ácido eláidico y la incidencia de diabetes tipo-2 en cohortes japonesas y norteamericanas (Itcho *et al.*, 2017).

1.8.4. Grasa trans, maternidad y lactancia

La grasa *trans* ingerida con la dieta en la madre gestante atraviesa la barrera placentaria y se instala en los fosfolípidos sanguíneos y tejidos fetales (Larqué *et al.*, 2001). Esto puede afectar tanto a la duración de la gestación como al peso del bebé al nacer (Koletzko & Müller, 1990). Se encontró una correlación inversa entre los contenidos en sangre de TFAs y PUFAs de prematuras y tejido fetal. Ante esta situación se planteó, si fuera conveniente fortalecer con ácido linoleico la dieta de la madre gestante, pues la grasa *trans* inhibe la conversión de los ácidos grasos esenciales (EFAs), que son vitales en las primeras etapas de la vida (von Houwelingen & Hornstra, 1994).

En definitiva, niveles crecientes de ácido grasos *trans* en plasma materno resultan adversos para:

- Crecimiento fetal, pues los ácidos grasos esenciales (EFAs) no pasan a PUFAs de cadena larga, como el ácido docosahexanoico (DHA), ni a prostaglandinas beneficiosas en los tejidos fetales (Dutta-Roy, 2000);
- Desarrollo neural y visual;
- Desarrollo post-natal (Innis, 2007).

La cantidad de TFA detectado en los fosfolípidos fetales se correlacionaban con los encontrados en los fosfolípidos maternos, que eran una huella de la ingesta de grasa *trans* de la madre (Craig-Schmidt, 2001).

Las ingestas de grasa *trans* de la madre afectan no sólo la calidad, sino también la cantidad de leche materna (Anderson *et al.*, 2005). El contenido de grasa *trans* en leche materna es fiel reflejo de la dieta más próxima ingerida por la madre. En España, el contenido promedio de TFA en leche materna es 0,98%, sobre grasa total (Boatella *et al.*, 1993), mucho menor que el de las madres norteamericanas (Chen *et al.*, 1995). Así, en Canadá, el contenido promedio de TFA en leche materna era del 1,9% sobre grasa total, y aún más elevado, del 6-7% en los Estados Unidos. Las madres canadienses, durante la lactancia, consumieron un 50% del total de ácidos grasos *trans*, procedentes de bollería/confitería y *snacks*, un 11% procedía de “comida rápida” (Innis & King, 1999).

1.8.5 Deterioro cognitivo y Alzheimer

Ya se ha visto cómo la grasa *trans* aumenta los niveles de colesterol plasmático. La distribución intracelular del colesterol, asimismo, modula la presencia del péptido beta-amiloide, que se conecta con la demencia (Barnard *et al.*, 2014). En el “Proyecto Envejecimiento y Salud de Chicago”, con más de 800 participantes y 4 años de seguimiento, utilizando un cuestionario de frecuencia (FFQ), se asoció el declive cognitivo y la incidencia de la enfermedad de Alzheimer al consumo continuado de ácidos grasos saturados (SFA) y grasa *trans* (TFA), mientras que ejercían un efecto de riesgo decreciente el consumo de grasa monoinsaturada (MUFA) y poliinsaturada (PUFA) (Morris & Tangney, 2014). Anteriormente, Morris *et al.*, (2004) habían realizado un seguimiento de 6 años en ancianos y encontraron una clara correlación directa entre ingestas elevadas de grasa *trans* y una mayor velocidad del deterioro cognitivo. La

Capítulo 1

Introducción: Definiciones y conceptos, ingestas poblacionales, efectos sobre la salud, determinación de grasa trans en productos alimentarios

presencia de grasa *trans* aumentaba los niveles de APP (“Amyloid Precursor Protein”) no amiloidogénica, cuando se comparaba con el comportamiento de los *cis*-MUFA y *cis*-PUFA (Grimm *et al.*, 2012). Las moléculas de ácidos grasos *trans* se incorporan a las membranas de las células cerebrales, alterando la capacidad de las neuronas para comunicarse, y afectando decisivamente el rendimiento mental con la edad (Ginter & Simko, 2016).

1.8.6 Obesidad

En Estados Unidos, en una cohorte de más de 16.000 hombres, un elevado consumo de grasa *trans* se asoció con un aumento moderado de la circunferencia de la cintura, después de ajustar para todos los factores involucrados en la evaluación del índice de masa corporal (Koh-Banerjee *et al.*, 2003). En la India y Pakistán, donde existía un consumo desmesurado de vanaspati y aceites de cocina con grasa parcialmente hidrogenada, también aumentó la medida (cm) de la circunferencia de la cintura y el índice de masa corporal entre la población (Ghosh, 2007). En una cohorte del prolongado “Nurses’ Health Study” (NHS) (20 años de seguimiento) se observó un aumento del peso corporal entre las mujeres con mayor consumo de grasa *trans* (Field *et al.*, 2007). Sin embargo, la mezcla en proporción adecuada de los isómeros ácido ruménico y *trans*-10, *cis*-12 CLA se mostró útil frente a la adiposidad abdominal (Whigham *et al.*, 2007).

1.8.7 Capacidad Reproductora

Se ha detectado asociación entre las ingestas de grasa *trans* en jóvenes y los parámetros de calidad del semen (Chavarro *et al.*, 2014). También se ha percibido un descenso de testosterona sérica, junto a una morfología anormal de los espermatozoides. Incluso ingestas de 1 E%, si son continuadas, podrían afectar a las hormonas de la reproducción en jóvenes (Mínguez-Alarcón *et al.*, 2017).

1.9 Alternativas a los aceites hidrogenados. Reformulaciones

Los aceites parcialmente hidrogenados han sido, mayoritariamente, la principal fuente industrial de grasa *trans*. Ya mucho antes de que la FDA no siguiera considerándolos como sustancias GRAS (“generally recognized as safe”), en 2015, de forma progresiva, a partir de 1990 las grandes compañías comenzaron las reformulaciones para evitar la grasa *trans* en los alimentos procesados. Se avanzó especialmente en la década 2000-2010 cuando el sector industrial implementó muchas iniciativas para reformular margarinas y “shortenings” (grasas anhidras y concretas). En esto tuvo mucho que ver la presión gubernamental sobre la industria alimentaria, y la presión sobre las franquicias de “comida rápida” (“fast-food”), simbolizadas en las decisiones legislativas que implementó Dinamarca, por ejemplo, para tomar ventaja en esta porfía. En otros países, como los Países Bajos, se implementó el conocido como “modelo Polder”, grupo de trabajo colaborativo entre los distintos sectores implicados (gobierno, industria, autoridades sanitarias, y unión de consumidores), que funcionó eficazmente (Katan, 2006).

Se contaba con grandes suministros de aceites vegetales comestibles, a nivel mundial, fundamentalmente aceites de palma y de soja, seguidos por el aceite de canola (que era una patente canadiense: aceite de colza rebajado de ácido erúxico) ¿Cuánto de esta producción global se convertía en aceites parcialmente hidrogenados? Al parecer, en 2007, casi un tercio de la producción, fundamentalmente de aceite de soja, en los Estados Unidos (Eckel *et al.*, 2007). La tarea de eliminar estos aceites hidrogenados de los suministros alimentarios exigía reemplazarlos por ciertos aceites/grasas con propiedades físicas, reológicas y sensoriales semejantes. Había que tener en cuenta consideraciones sobre:

- Disponibilidad;
- Logística de las cadenas de suministro;
- Aceptación del consumidor;
- Costes (Borra *et al.*, 2007).

El empleo de aceites tropicales (aceites de palma, palmiste y coco) fue la decisión a tomar más fácil e inmediata, a la vez que económica, sobre todo en lo que se refiere al aceite de palma. Se trata de un aceite semi-sólido, a temperatura ambiente, de buena

conservación y palatabilidad, pero que contiene un 50 % de grasa saturada (44% de ácido palmítico). Mientras aumenta significativamente los niveles de HDL-C respecto al aceite parcialmente hidrogenado, también incrementa las lipoproteínas LDL-C con respecto a los aceites vegetales bajos en grasas saturadas; además, si desplazaba a MUFAs y PUFAs aumentaban significativamente las LDL-C (Hayes & Poncznk, 2010). A pesar de todo esto, se han utilizado bastante como alternativa a los PHVOs el aceite de palma, pero es una fuente de grasa saturada en muchas economías emergentes (Idris & Dian, 2005), es preferible usar aceites vegetales MUFA y PUFA y estearina de palma (Tarrago-Trani *et al.*, 2006).

Se implementaron estrategias para inducir a la industria alimentaria al empleo de grasas insaturadas como sustitutos de los PHVOs, en concreto, aceites alto-oleico o medio-oleico, para poder desterrar el uso generalizado de aceites tropicales. Otras estrategias fueron actuar sobre los factores que rigen el proceso de hidrogenación para conseguir bajos contenido de triglicéridos saturados y de ácidos grasos *trans*. Para ello se combinaron condiciones de baja temperatura (100 °C) con una presión de hidrógeno muy alta (1,0 MPa) y catalizadores de platino sobre soportes de zeolitas, o un catalizador nanoestructurado con paladio inmovilizado (Skeaff, 2009; Philippaerst *et al.*, 2013). Igualmente, la hidrogenación electroquímica significó un sustancial avance para reducir la formación de ácidos grasos *trans* en los aceites vegetales.

Como alternativa para la sustitución de las grasas hidrogenadas surgieron dos nuevas tecnologías:

- Interesterificación;
- Fraccionamiento.

La interesterificación supone una redistribución de los ácidos grasos en el esqueleto del triacilglicerol. La posición del ácido graso en la molécula es crítica para consolidar una grasa con las propiedades (físicas, reológicas, sensoriales) que no contiene grasa *trans*. No cambia el perfil de ácidos grasos de partida, lo que cambia es la morfología cristalina para conseguir el contenido de grasa sólida deseada. Esta nueva redistribución provoca cambios en las propiedades funcionales de las grasas, mejorando la consistencia. Se consiguen así grasas “cero-*trans*” con rangos de puntos de fusión aptos para emplearlos en el procesado de alimentos.

1.9.1 Interesterificación química

Se lleva a cabo en un reactor discontinuo, a 110-160 °C, donde el aceite se deseca a vacío, para separar las trazas de agua y de ácidos grasos libres que desactivarían el catalizador. Luego, se añade metóxido o etóxido sódico o potásico 0,1-0,3 % y se deja reaccionar un tiempo. Se retira el catalizador mediante lavado del aceite con agua, o acidificación. Se filtra, para retirar las trazas de jabón, y el producto final se calienta a vacío, para eliminar los ésteres metílicos de los ácidos grasos (FAMEs). La reacción es rápida (tarda unos minutos). Se produce un intercambio aleatorizado inter- e intra-molecular, obteniéndose glicéridos mixtos, mezclas semi-sólidas y plásticas, exentas de grasa *trans* (Hunter, 2006; van Duijn, 2005).

1.9.2 Interesterificación enzimática

Esta interacción puede tener lugar entre aceites vegetales insaturados con glicéridos saturados C12-C16, catalizada por lipasas estereoespecíficas sn-1,3 inmovilizadas. Es una reacción más suave y lenta (puede tardar varias horas) que la tecnología química (Zhang *et al.*, 2004). Tiene la ventaja de que puede detenerse a voluntad, a un tiempo fijado, lo que permite una programación para obtener un producto con la composición, textura y reología deseada, pudiéndose seguir los cambios cristalinos microscópicamente (Mozaffarian *et al.*, 2010). Se consiguen productos “cero-*trans*” de buen sabor, elaboración con un menor contacto con las sustancias químicas y de un coste razonable (Kadhun & Shamma, 2017). En la Tabla 5 se ofrece una comparación entre las dos tecnologías de interesterificación.

Tabla 5. Comparación entre las interesterificaciones química y enzimática (List, 2004).

Química	Enzimática
Proceso discontinuo	Proceso continuo
Reacción no específica. Los triglicéridos se forman en distribución aleatoria	Reacción específica para sn-1,3
Las curvas de grasa sólida son relativamente planas	Las curvas de grasa sólida tienen más pendiente, mejor funcionalidad
El catalizador es sensible a la humedad	Uso de catalizadores enzimáticos (lipasas), más caros
Formación de productos co-laterales (jabones, FAMEs, mono- y diglicéridos)	No se forman productos co-laterales
Requiere post-procesado (eliminar catalizador, retirar jabones, blanqueamiento)	No necesita post-procesado

En las interesterificaciones se suelen combinar, generalmente, un aceite totalmente hidrogenado (bloque sólido) con un aceite vegetal insaturado (PUFA). Se obtiene así una grasa con buenas propiedades de fusión, textura, adecuada morfología cristalina, estabilidad oxidativa y mejoradas propiedades funcionales (Korver & Katan, 2006).

1.9.3. Fraccionamiento

En esta alternativa tecnológica se hace pasar el aceite de forma continua por la unidad de enfriamiento, hasta llegar a la sobresaturación y la formación de núcleos cristalinos. Se forman la fase sólida (estearinas) y la fase líquida (oleínas), que se pueden separar por filtración a vacío, o por centrifugación. Para evitar que el aceite líquido penetre en los cristales, se pueden utilizar disolventes (acetona, hexano), para una separación más pura. O bien, el empleo de materiales, como los fosfolípidos, o

Capítulo 1

Introducción: Definiciones y conceptos, ingestas poblaciones, efectos sobre la salud, determinación de grasa trans en productos alimentarios

emulsificantes (mono- y diglicéridos). Puede haber un doble fraccionamiento (Smith, 2005). Se suele trabajar con aceites de palma y girasol modificado.

Son posibles dos clases de estearinas. La referida como “estearina blanda”, que se usa en bollería y pastelería. La “estearina dura” podría sustituir a la manteca de cacao en los productos de chocolatería (Herrera *et al.*, 2015). Los cristales de morfología α (inestable) al principio pasan en el producto final a la morfología β (triclínica) la más estable. Se consiguen propiedades óptimas, de acuerdo con el destino del producto en el procesamiento de alimentos, y presenta como ventaja que, al tratarse de un procedimiento puramente físico, es una técnica limpia, de buen impacto medioambiental (Yilmaz & Agagündüz, 2022).

1.9.4 Organogeles

En los últimos años se han estudiado e introducido nuevos métodos de modificación de los lípidos para conseguir nuevos productos para uso en procesamientos (horneados, confitería y otros procesados) libre de grasa *trans*, con bajos contenidos de grasa saturada y buenas proporciones de PUFAs (Patel *et al.*, 2020).

Se han conseguido sistemas estructurados con niveles reducidos de grasa saturada, pero sin modificaciones estructurales o químicas de las moléculas de triglicéridos; se trata de ofrecer consistencia, eliminar los ácidos grasos *trans* y conseguir un perfil lipídico saludable. Los organogeles son sistemas con una fase orgánica líquida no-polar y agentes estructurales que promueven la formación de una red cristalina tri-dimensional, que atrapa dentro de sí el aceite líquido. Se emplean agentes estructurantes (fitoesteroles, lecitinas, orizanoles, ceras, ceramidas, monoglicéridos), que deben ser sustancias GRAS, de grado alimentario, y poder usarse a bajas concentraciones (Park & Maleky, 2020). Recientemente, se han obtenido bigeles a partir de oleogeles de cera de abeja, aceite de canola y alginato sódico, e hidrogeles de carboximetilcelulosa. La dureza de las “cookies” en que se emplearon era similar a la obtenida con una grasa anhidra (Quilaqueo *et al.*, 2022).

1.9.5 Aplicación de la ingeniería genética

Cuando se deciden las alternativas al empleo de los aceites parcialmente hidrogenados es necesario que con la modificación tecnológica no se provoque un

ascenso de la grasa saturada, ni grandes cantidades de PUFAs, que alteren la estabilidad oxidativa.

Ambos casos se pueden lograr aplicando la ingeniería genética. Actuando sobre la expresión transgénica proporcionan el medio de rebajar la carga de ácidos grasos saturados del aceite. Al mismo tiempo, los avances en genética molecular y bioquímica de la síntesis de aceites vegetales en las plantas oleaginosas proporcionan las herramientas para rebajar la carga de PUFAs, bloqueando su síntesis durante el desarrollo de la semilla, consiguiendo variedades alto-oleico, bajo-PUFA, en los cultivos de soja, colza, y otras plantas oleaginosas (Wallis *et al.*, 2022).

1.10 Análisis de la grasa *trans*

Hay dos metodologías que han predominado: la cromatografía de gases y la espectrofotometría infrarroja. En la actualidad, ha descendido el uso de la cromatografía de gases (que puede conservar un papel en la investigación de base), en favor de un empleo más generalizado de la espectrofotometría infrarroja, por razones que más abajo esgrimiremos, particularmente cuando sólo se requiere el conocimiento de los ácidos grasos *trans* totales, para controlar sus niveles en productos alimentarios, y comprobar si se cumple la legislación alimentaria, o si se declaran falsos negativos (por ejemplo, declarar en la etiqueta “libre de grasa *trans*”, cuando entre los ingredientes del producto aparecen aceites hidrogenados). Más concretamente, se aplica la espectroscopía infrarroja de transformadas de Fourier con reflexión total atenuada (ATR-FTIR). Incidentalmente, se ha aplicado la resonancia magnética nuclear de carbono-13 (^{13}C -NMR) para determinar el número absoluto de carbonos-*trans* alílicos (Miyake *et al.*, 1998).

1.10.1 Cromatografía de gases

Al principio, en las décadas de los años 1970s y 1980s, se usaron columnas capilares de polietilenglicol (OV-275, Silar, CP-Sil 88) cortas (40-50 m) y 0,32 mm de diámetro interno, pero existían co-elución de las formas *cis* y *trans* y solapamiento con los PUFAs de cadena larga (Ulberth & Henninger, 1992). Para evitar estos problemas técnicos, se introdujeron en los 1990s las columnas capilares largas, altamente polares (100 m x 0,25 mm de diámetro interno x 0,20 μm de espesor de la fase estacionaria) SP-2340, de policianopropilsiloxano, térmicamente estables. Además, se añadió una etapa de

pre-separación por cromatografía de capa fina (AgNO_3 -TLC), o bien, por cromatografía líquida de alta resolución (AgNO_3 - HPLC). Esta fue la base del método oficial AOCS 1 h-0,5, con columnas SP-2560, y derivatización de los ácidos grasos a ésteres metílicos (FAMES), pudiéndose emplear las alternativas del detector de ionización de llama (GC-FID) o de espectrometría de masas (GC-MS) (Albuquerque *et al.*, 2018). El isómero *cis*- presenta una afinidad más fuerte por el ciano-dipolo, queda retenido en la columna, y el isómero *trans* se eluye antes que el *cis*.

Aunque la cromatografía proporciona información sobre el perfil lipídico de la mezcla de isómeros, y desde el punto de vista cualitativo puede presentar utilidad, tiene varios inconvenientes, como son:

- Las columnas capilares son de vida corta;
- La técnica consume tiempo, es laboriosa, y cara;
- Requiere derivatización (FAMES), debido a la polaridad de los ácidos grasos;
- Depende de la disponibilidad de estándares cromatográficos adecuados.

En definitiva, la técnica cromatográfica no resulta tan adecuada cuando se trata de análisis de control rutinarios y rápidos, donde interesa la cuantificación global de todos los enlaces *trans* aislados, ya procedan de un ácido monoenoico, o de un ácido polienoico. Para esto, la técnica de infrarrojo ATR-FTIR ofrece indudables ventajas.

1.10.2 Espectroscopía infrarroja

Antes de la introducción de los métodos instrumentales existían dos métodos generalizados para la determinación de los ácidos grasos *trans*. El primero de ellos era un método gravimétrico que se basaba en la insolubilidad en disolventes orgánicos específicos de las sales de plomo del ácido elaídico (95% de rendimiento). El otro método se fundamentaba en la diferencia entre las constantes de equilibrio de las reacciones de los isómeros *cis* y *trans*- con yodo en CCl_4 . Ambos métodos eran lentos y laboriosos, de dudosa confiabilidad, requerían un gran tamaño de muestra y se trabajaba en un entorno tóxico (Swern *et al.*, 1950).

Estos métodos fueron sustituidos por los métodos espectroscópicos. El espectro infrarrojo se puede dividir en tres partes:

Capítulo 1

Introducción: Definiciones y conceptos, ingestas poblaciones, efectos sobre la salud, determinación de grasa trans en productos alimentarios

- 14.000-4.000 cm^{-1} : bandas anchas, solapamientos entre bandas, dificultades para las asignaciones (“Near-InfraRed spectroscopy”, NIR).
- 4.000-400 cm^{-1} , más empleado, se localizaron los principales grupos funcionales, y la huella dactilar de la grasa (“Mid-InfraRed spectroscopy”, MIR).
- 400-50 cm^{-1} , infrarrojo lejano, de escaso uso (“Far-InfraRed”, FIR).

La utilización del infrarrojo medio (MIR) preferentemente al uso del infrarrojo cercano (NIR) se fundamenta, especialmente, en que:

- las bandas son más estrechas;
- es mayor la ratio señal-ruido (SNR);
- ofrece una mayor resolución (Guillén & Cabo, 1999).

Rasmussen *et al.* (1947), trabajando en los laboratorios (I+D) de la petrolera SHELL en California, trazó los espectros IR de olefinas (octenos) y asignó por primera vez la banda a 10,36 μm (966 cm^{-1}) a la configuración *trans*. Se pudo comprobar que los espectros IR de ácido eláidico, ácido vacénico y elaidato de metilo ofrecían todos ellos la misma banda de absorción IR característica del isómero geométrico *trans*- (10,36 μm , 966 cm^{-1}), banda ausente en los compuestos *cis*-insaturados y en los ácidos grasos saturados. Las bandas características de la forma *cis* aparecían a 3.050 cm^{-1} y 1.640 cm^{-1} , y dichas bandas de absorción desaparecían en el espectro IR de la trielaidina (Walker *et al.*, 2007). El protagonismo de los grupos unidos a los carbonos del doble enlace es desdeñable en cuanto a su posible influencia sobre la localización de la banda *trans*- a 966 cm^{-1} (Cleverley, 1960). Todos los isómeros posicionales *trans*-18:1 presentaban la misma extinción específica a 966 cm^{-1} : no se observan diferencias ni en el máximo de absorción de la banda, ni en la altura y área de la banda entre los ácidos eláidico y vacénico.

Todos los mono-*trans*, ya sean *trans*-18:1, *trans*-18:2, *trans*-18:3, *trans*-16:1, o *trans* PUFAs, en general, presentaban la misma extinción específica. Los di-*trans* presentaban una extinción doble que la de las mono-*trans*, pero sólo se encuentran en concentraciones traza (Shreve *et al.*, 1950).

Se podían reconocer grasas saturadas (por ejemplo, las grasas tropicales, aceites de palma, palmiste y coco) con niveles de grasa *trans* inferior al 1%, sobre grasa total a través de:

- La posición de la banda máxima a 956 – 962 cm^{-1} ;

Capítulo 1

Introducción: Definiciones y conceptos, ingestas poblaciones, efectos sobre la salud, determinación de grasa trans en productos alimentarios

- Una mayor anchura de banda que la de la banda *trans* a 966 cm⁻¹;
- La asimetría de la banda.

Por debajo de los niveles de 1% TFA, sobre grasa total, en presencia de mayores niveles de ácidos grasos saturados, tiene lugar un desplazamiento hipsocrómico, desde 966 cm⁻¹ hasta 963 – 961 cm⁻¹.

En la grasa *trans* de origen industrial predomina mayoritariamente el ácido elaídico (*trans*-9 18:1) y el ácido vacénico, cuyo origen hay que encontrarlo en la leche y carne de los rumiantes. Los isómeros geométricos *trans*-18:2, *trans*-18:3, *trans*-14:1, *trans*-16:1, *trans*-20:1 y *trans*-22:1 son minoritarios, y suelen encontrarse en niveles iguales o menores al 1-2% TFA, sobre grasa total. Las bandas sobre 985 cm⁻¹ y 950 cm⁻¹ asignables a isómeros *cis*, *trans*-CLA y *trans,cis*-CLA, son respectivamente, y a 990 cm⁻¹, asignable a los *trans,trans*-CLA. Las bandas de los ácidos linoleicos conjugados (CLAs) sólo podrían interferir cuando alcanzan niveles del 1%, sobre la grasa total, en alimentos grasos con menos de 5% TFA, sobre la grasa total. Esto podría suceder si estuvieran presentes leche o productos lácteos, y se soslayaría aplicando el método de la adición estándar. En el mundo natural vegetal sólo se ha detectado por encima del 1% de CLAs en el aceite de tung (aceite secante de semilla de origen oriental). El aceite de ricino contiene grupos hidroxilo que podrían modificar la intensidad de la vibración de deformación fuera del plano del -CH- *trans* (Mossoba *et al.*, 2007).

1.10.3 Aplicación de la espectrofotometría infrarroja a la determinación de grasa trans por transformada de Fourier y reflexión total atenuada (ATR-FTIR)

Los primeros métodos usando la espectrofotometría de infrarroja dispersiva calculaban el componente *trans* en porcentaje (%) en peso aplicando la Ecuación 2:

$$\%TFA = \frac{(K_{obs}-K_c)}{(K_t-K_c)} \times 100 \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde:

K_{obs} = coeficiente de extinción observada (Ecuación 3);

K_c = coeficiente de extinción del compuesto *cis*-puro;

K_t = coeficiente de extinción del compuesto *trans*-puro.

$$K_{obs} = \frac{\text{densidad óptica a } 10,36 \mu\text{m}}{\text{concentración } (\frac{g}{L}) \times \text{espesor celda (cm)}} \quad \text{Ecuación 3}$$

Este método exigía la determinación previa de los coeficientes de extinción (K) de los componentes puros (trioleina, trielaidina, etc.), basándose en la ley de Lambert-Beer, lo que exigía tiempo y laboriosidad, y la preparación de disoluciones de la muestra a medir en disolventes tales como CS₂ o CCl₄, volátiles y tóxicos (Shereve *et al.*, 1950).

Posteriormente se aplicó el método oficial de la AOCS Cd 14-61, que se basaba en la medida de la altura de la banda *trans* a 966 cm⁻¹, más consistente que el método de la IUPAC, que se basaba en la integración (área) de la banda. Para evitar problemas de interferencias de fondo de los acilgliceroles (zona de absorción, 962-968 cm⁻¹), y la posible interferencia de la banda a 933 cm⁻¹ (vibración de deformación del -OH del grupo carboxilo) había que obtener los ésteres metílicos de los ácidos grasos (FAMEs) previamente (Cleverley, 1960). Para el infrarrojo dispersivo, por los problemas con la línea-base, el límite confiable más bajo de cuantificación era el 15 %TFA, sobre peso total. Había que hacer correcciones por la desviación (pendiente) de la línea-base, incluso hacer uso de la ratio Absorbancia a 966 cm⁻¹/ Absorbancia a 1.163 cm⁻¹ (Dutton, 1974).

A finales de 1980s se introducen las transformadas de Fourier (FTIR). Esto supuso un gran avance tecnológico; así, respecto al infrarrojo dispersivo,

- Se mejora la ratio señal-ruido (SNR), debido a que se promedian bandas múltiples;
- Se logra una mayor exactitud en la calibración de las longitudes de onda, debido a la presencia de un láser de referencia Helio-Neón;
- Se mejora la velocidad del ensayo, por intervención del interferómetro de Michelson;
- Se mejora la manipulación espectral, como consecuencia de la digitalización de los datos espectroscópicos.

En la técnica FTIR se irradia con una banda ancha continua que cubre la región espectral a examinar, a diferencia de las longitudes de onda individualizadas generadas por sistemas de rejilla o prisma. Esto se logra con el interferómetro de Michelson, que codifica las frecuencias incidentes provenientes de la fuente de radiación, y dichas

Capítulo 1

Introducción: Definiciones y conceptos, ingestas poblaciones, efectos sobre la salud, determinación de grasa trans en productos alimentarios

frecuencias se convierten en una señal sinusoidal, característica de cada longitud de onda. Se consigue el interferograma, que posteriormente se descodifica mediante una transformación de Fourier (algoritmo matemático) y, de este modo, se obtiene información interpretable acerca del espectro infrarrojo de la muestra grasa (Guillén & Cabo, 1997).

Aunque la reflectancia total atenuada (ATR) fue mencionada en 1961, no se aplicó a la determinación de ácidos grasos *trans* hasta bastantes años después (ATR-FTIR) (Dutton, 1974). En la técnica ATR-FTIR el paso de luz efectivo es inherentemente preciso, ya que se define como una función de:

- Número de reflexiones internas;
- Ángulo de incidencia de la radiación infrarroja,
- Longitud de onda de la radiación infrarroja, e
- Índice de refracción del cristal ATR (ZnSe, diamante) y de la muestra de grasa que se ensaya, a una temperatura dada (Braue & Panella, 1987; Belton *et al.*, 1988).

Los métodos oficiales de la “Association of Official Analytical Chemists” (AOAC O.M. 994.14), de 1994, y de la “American Oil Chemists’ Society” (AOCS O.M. Cd 14-95), de 1995, desafortunadamente, no eran satisfactorios, puesto que asumían que la banda *trans* a 966 cm^{-1} estaba aislada, cuando de hecho se solapaba con otras bandas características del espectro IR. Dicho solapamiento ocasionaba una línea-base inclinada y una banda de absorción asimétrica que reducía la exactitud de las medidas, particularmente para niveles *trans* por debajo del 2%, sobre grasa total.

En 1996 se propuso y extendió el nuevo procedimiento para eliminar la inclinación de la línea-base (Mossoba *et al.*, 1996). Había que referenciar el espectro de rayo único de la muestra frente al del espectro de referencia espectral, libre de grasa *trans*. Había que acudir a un aceite puro refinado, cuya composición lipídica fuese lo más aproximada posible a la de la muestra que se ensaya. Por ejemplo, se acudía a una muestra estándar refinada en frío de aceite de soja. De esta manera se obtenía una banda de absorción simétrica sobre un fondo espectral (línea-base) horizontal. Con la introducción de las nuevas celdas ATR ya no se requería derivatización a FAME, ni preparar una disolución de la muestra en un disolvente volátil y tóxico, como el CS_2 . Se podía integrar, el área bajo la banda espectral, entre los límites de 990 cm^{-1} y 945 cm^{-1} . La utilización de la celda

Capítulo 1

Introducción: Definiciones y conceptos, ingestas poblacionales, efectos sobre la salud, determinación de grasa trans en productos alimentarios

ATR de ZnSe aumentaba la rapidez del método. El procedimiento no requiere preparación de la muestra, y tardaba aproximadamente 5 minutos en promediar la señal espectroscópica, integrar el área de banda, y calcular el contenido de grasa *trans* a partir de la recta de calibrado, confeccionada con mezcla de estándares trioleína (después, tripalmitina)-trielaidina. Los valores obtenidos de grasa *trans* aplicando la técnica ATR-FTIR presentaban muy buena correlación con los obtenidos a través de la cromatografía de gases, como se confirmó en un estudio colaborativo que implicó a 30 laboratorios (Mossoba *et al.*, 1996). La capacidad de la celda ATR era de unos pocos microlitros, y el límite inferior de cuantificación se estableció en 0,8 %TFA, sobre grasa total. El método fue oficializado y validado en sendos estudios colaborativos, como “AOCS Official Method Cd 14d-99” (Adam *et al.*, 2000) y como “AOAC Official Method 2000.10” (Mossoba *et al.*, 2001), mejorando respecto a los anteriores métodos oficiales AOCS Cd 14-95 y AOAC 994.14:

- Exactitud;
- Repetibilidad;
- Reproducibilidad.

1.10.4 Método de espectroscopía infrarroja ATR-FTIR de segunda derivada

El último método oficial propuesto para determinar grasa *trans* aislada total por espectrofotometría infrarroja es el “AOCS Official Method Cd 14e-09”, y se trata de la segunda derivada del método ATR-FTIR anterior (AOCS, 2009). Este método fue validado por un estudio colaborativo entre varios laboratorios de varios países en 2010 (Mossoba *et al.*, 2011) y es el que se utiliza en esta Tesis, y se comentará más adelante en los capítulos pertinentes.

CAPÍTULO 2:

Legislación y Recomendaciones

Capítulo 2: Legislación y Recomendaciones

No se conoce ningún efecto beneficioso atribuible a los ácidos grasos *trans* de origen industrial (IP-TFA), mientras que en el caso de los ácidos grasos procedentes de rumiantes (R-TFA) está todavía a debate su posible nocividad o beneficio. En cualquier caso, estudios bien diseñados parecen coincidir en que los R-TFA no parecen mostrar nocividad, siempre que no se sobrepase un determinado nivel de ingesta. Por lo tanto, las legislaciones de los distintos países se han centrado en los IP-TFA, lo que, por otra parte, está de acuerdo con la propia definición del término “ácido graso *trans*” o “grasa *trans*” que ofrece la “Food & Drug Administration” (FDA), el “Codex Alimentarius”, y otros organismos, como la Organización Mundial de la Salud.

El propósito común de las distintas legislaciones es limitar el contenido de grasa *trans* en los productos alimentarios y reducir su ingesta, sobre todo en las poblaciones más expuestas como niños, adolescentes, y personas menos favorecidas. Las medidas legislativas se han centrado, principalmente en:

- Etiquetado, voluntario u obligatorio, del contenido de grasa *trans* del producto;
- Reformulaciones en el procesado de alimentos;
- Prohibiciones a nivel local, regional o nacional, del uso o venta de productos procesados que contengan grasa *trans*.

Para comprender mejor la evolución de las medidas legislativas tomadas en torno a la grasa *trans*, se expone en la Figura 5 una “línea del tiempo”, donde se especifica, en orden cronológico, las legislaciones más determinantes promulgadas en estos últimos años.

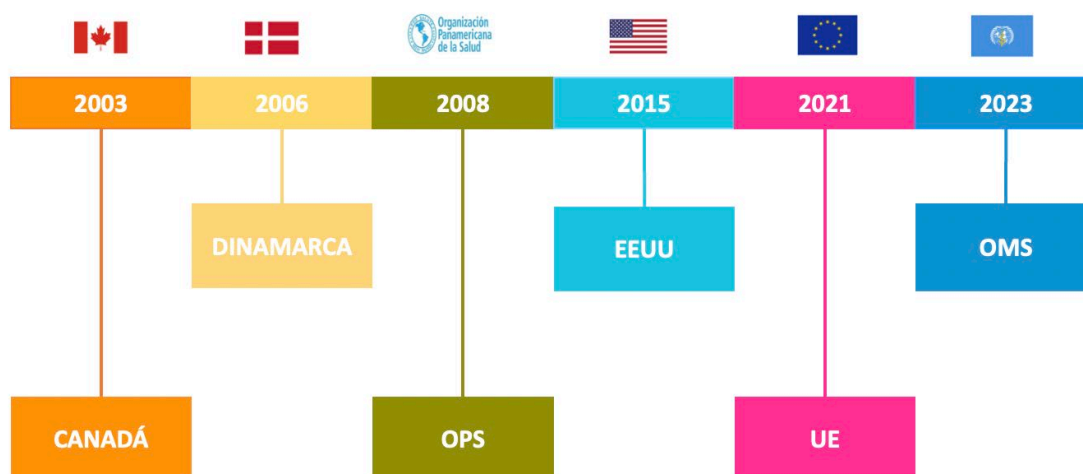


Fig. 5. Línea del tiempo de las principales medidas legislativas sobre la grasa *trans*.

Para la reducción del contenido de grasa *trans* en los productos alimentarios se han aplicado políticas diversas, que incluyen:

- Auto-regulación voluntaria;
- Declaración obligatoria en el etiquetado;
- Declaración obligatoria y límites voluntarios;
- Prohibiciones a nivel local;
- Prohibiciones a nivel nacional;

lo que ha conseguido un descenso apreciable del contenido de ácidos grasos *trans* (TFAs) en alimentos procesados, y de sus ingestas poblacionales a nivel mundial, con algunas excepciones.

Del tratamiento de 26 estudios seleccionados entre los años 2005 y 2012 se dedujo que, en general, a lo largo de estos años habían descendido los contenidos de grasa *trans* y de la suma ácidos grasos saturados más ácidos grasos *trans*, no había aumentado la grasa saturada, y se percibía un aumento de la grasa insaturada (MUFA + PUFA), en los productos alimentarios implicados. Por lo que se refería a los productos “libres de grasa *trans*”, la incidencia era muy alta (92-100%) cuando se habían adoptado prohibiciones, tanto a nivel local como nacional, salvo en los casos de los establecimientos de “comida rápida” (59% de incidencia). En los casos de etiquetado obligatorio, la incidencia fue buena en restaurantes (80%), y mejor en supermercados (95%); en productos de horneado/bollería/pastelería, la incidencia fue variable

y no tan satisfactoria (42-77%); y los peores resultados (45% de la incidencia) se obtuvieron en las situaciones de autorregulación voluntaria por parte de la industria (Downs *et al.*, 2013).

Ha sido importante la concienciación de los consumidores y sus asociaciones sobre el tema de las grasas *trans*. En este sentido países como Francia, Alemania y Reino Unido han desarrollado campañas informativas y educativas para que los propios consumidores ejerzan presión sobre la industria (Coombes, 2011). En algunas franquicias de establecimientos de comida rápida aparece en su página WEB información sobre ingredientes y comidas, con información sobre ácidos grasos saturados y *trans*.

Dietistas americanos han estudiado el comportamiento de los ciudadanos en sus compras de alimentos y desarrollado campañas de formación para el conocimiento de las grasas *trans* y saturadas (Eckel *et al.*, 2009).

Dado el creciente interés de la población por la conexión dieta-salud, son importantes los incentivos y la labor de los medios de comunicación (prensa, radio, TV) y su influencia en la toma de decisiones de los consumidores (Unnevehr & Jagmanaitis, 2008). En este sentido se ha llegado a proponer que los datos sobre el contenido de TFAs aparezcan en la etiqueta del producto como incrementos sucesivos de 0,1 g partiendo de 0 gramos (Brandt, 2011).

2.1 Dinamarca

Dinamarca fue, con Canadá, uno de los primeros países que legislaron sobre las grasas *trans*, en 2003 (Stender & Dyerberg, 2004). En dicho año limitó el contenido de grasa *trans* de los productos alimentarios vendidos en el país, incluidos los productos de importación y las comidas en lugares de restauración, al 2% sobre la grasa total. Por aquel entonces la población ingería como promedio 30 g de TFA/p/d de grasa *trans* producida industrialmente (IP-TFA), pero la preocupación se había extendido antes, después de la aparición del artículo de Willett (1993) sobre la aparente relación directa entre las ingestas de grasa *trans* y las enfermedades cardiovasculares, impresiones que corroboró el Consejo de Nutrición de Dinamarca (Stender & Dyerberg, 2004).

Como hubo ciertas discrepancias (algunos países europeos manifestaron que la normativa danesa iba en contra del espíritu del libre comercio) y puntos de vista contradictorios en la Comisión Europea, la Comisión demandó un pronunciamiento de la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA). El grupo de expertos europeos emitió un informe (EFSA, 2004)

por el que concluía que la medida restrictiva danesa se consideraba innecesaria por el momento, y que la información en el etiquetado nutricional sería suficiente para proteger a los consumidores. Se plantearon entonces diversos pleitos. Sin embargo, en marzo del 2007, la Comisión Europea decidió retomar el caso y, a la vista de nuevas evidencias científicas autorizadas y sus argumentos, decidió admitir con pleno derecho la legislación danesa, y las demandas judiciales se reiteraron (Astrup, 2006; EFSA, 2010). La normativa danesa había entrado en vigor en enero del 2004, después de un período de transición de 6 meses.

Estas medidas legislativas recibieron el apoyo del gobierno y de la comunidad, la colaboración voluntaria de la industria, y la fuerza motora del Consejo Nacional de Nutrición (Leth *et al.*, 2006). Después de la entrada en vigor, las tasas de fallecimiento por causa cardiovascular descendieron un 3,2%, comparado con países del entorno donde no se implementaron restricciones (Restrepo & Rieger, 2016). Se pueden ejemplificar la forma de proceder y la rigurosidad aplicada. En 2004, después de controlar, para ver si cumplían la reciente legislación en Dinamarca, 10 categorías de alimentos de los que se presuponía mayores contenidos de grasa *trans*, nueve de ellas cumplían con la legislación (menos de 2% de grasa *trans*, sobre grasa total), pero un producto contenía 6%. Se trataba de *dónuts* de una determinada franquicia procedente de Bélgica (este país no tenía entonces legislación referente a la grasa *trans*) que los habían utilizado en el procesado aceite parcialmente hidrogenado, PHVO. En cuestión de horas toda esta partida fue retirada de las estanterías. En 2006, en un restaurante de Ikea en Copenhagen se encontraron patatas fritas con 10% de grasa *trans*, sobre grasa total; el producto fue retirado en cuestión de horas, después de que la noticia fuese publicitada por la televisión pública en hora punta (L'Abbé *et al.*, 2009).

2.2. Canadá

Desde el 2002 se venía elaborando la normativa de Canadá, que aparece en enero de 2003, y entra en vigor en diciembre de 2005. Para confeccionar la legislación y monitorizar el cumplimiento de esta, “Health Canada” creó un grupo de trabajo. Se limitaba el contenido de grasa *trans* en aceites vegetales y margarinas blandas al 2%, sobre grasa total, y en el caso de los demás alimentos, incluidos los servidos en restaurantes, la venta al por menor, y servicios de alimentos (“catering”), al 5%, sobre grasa total. Si en 2003 la etiquetación era voluntaria, en 2005 los “Food and Drug Regulations (FDR)” exigían la declaración obligatoria en el etiquetado nutricional de la cantidad de ácidos grasos *trans* (TFAs) en gramos por ración del producto alimentario. Una declaración “cero-*trans*” o “libre de *trans*” podía hacerse si eran menos de 0,2 g por ración, y contenía menos de 0,2 g de grasa saturada (bajo en ácidos grasos saturados) (Ratnayake *et al.*, 2007), condiciones más exigentes que las que propuso la legislación estadounidense (FDA, 2003).

El gobierno canadiense exhortó a la industria alimentaria para que se alcanzaran estos límites en el plazo de dos años (2005-2007), y siguió de cerca sus acciones y las ingestas poblacionales. La declaración de TFA aparecía en la etiqueta, en una línea separada, debajo de la declaración de grasa saturada (Kris-Etherton & Innis, 2007). Se incentivó a los fabricantes para que en las reformulaciones emplearan MUFAs o PUFAs, evitando en lo posible el uso de aceites tropicales, que aumentarían los niveles de grasas saturadas (Health Canada, 2006).

La normativa establecida, combinada con las limitaciones voluntarias, logró que se produjera un 30% de reducción de ingesta de grasa *trans* en la población canadiense, que estaba a la cabeza de las ingestas en el mundo occidental (Ratnayake *et al.*, 2009 a). En 2009, el 80% de los productos alimentarios cumplían los límites legales, un buen avance si se comparaba con el año 2005, donde sólo el 50% de los productos cumplían estos límites (Ratnayake, 2009 b). Finalmente, ante el gran número de evidencias contrastadas en la literatura científica, y siguiendo los pasos de la “Food and Drug Administration”, se declaró ilegal para los productores usar grasas conteniendo ácidos grasos parcialmente hidrogenados (PHVOs) en el procesado de alimentos, incluyendo los importados y los menús en restauración. Estas grasas hidrogenadas fueron calificadas por “Health Canada” (2017) dentro del grupo de “contaminantes y otras sustancias adulterantes de los alimentos”.

2.3 Estados Unidos

La normativa promulgada por la “Food and Drug Administration” en 2003 (FDA, 2003), establecía la obligatoriedad de declarar en el etiquetado nutricional el contenido de grasa *trans* de origen industrial, justo debajo de la información sobre el contenido de grasa saturada por ración del producto alimentario. Se podía declarar un producto “cero-*trans*” si su contenido estaba por debajo de 0,5 g de TFA de origen industrial por ración. Esta ley FDA-2003, que entró en vigor en enero de 2006, fue la culminación de un proceso de varios años. En 1990 el Congreso Norteamericano aprobó la Ley de Etiquetado Nutricional (NELA). Pocos años más tarde, el “Centro para Uso de la Ciencia en el Interés Público”, presionaba a la FDA para que se informara en las etiquetas de los contenidos de grasa saturada y de grasa *trans*, como ya lo hacía el “Palm Oil Institute” de Malasia. En 1994 se registró una petición ciudadana de salud referente a la grasa *trans*. En 1999 la Agencia publicó propuestas y abrió un debate público, acompañando indicaciones acerca de procurar un mínimo de ingesta de TFA, y ya se presentaban cambios legislativos más eficaces (Wilkening, 2001). Finalmente, el 11 de julio del 2003 apareció la normativa publicada (FDA, 2003) en la revista oficial de la agencia gubernamental (List, 2004).

La FDA se había mantenido inmersa en la problemática de las grasas *trans* todos estos años a través de varias actuaciones, como:

- Revisión de comentarios de expertos;
- Llevando a cabo estudios que implicaban a los consumidores;
- Revisando críticamente la producción científica.

para intentar asistir a los consumidores (Moss, 2006). La declaración obligatoria del contenido de grasa *trans* también ha influido en la confección de los menús escolares. Instituciones sanitarias y hospitales consideraron la prohibición de productos que declaran TFAs en sus cocinas y apareció una “ley de cuidados razonables” que obligaba, a requerimiento del paciente o del cliente, a ofrecer información sobre los contenidos de grasa total, grasa saturada y *trans* de los menús o comidas (Aase, 2009). Desde la entrada en vigor de la normativa FDA, en 2006, el contenido de grasa *trans* en la dieta típica americana descendió desde 4,6 g/p/d hasta 1 g/p/d (Doell *et al.*, 2012).

El gobierno federal estadounidense realiza controles periódicos para comprobar si se cumple la normativa. Según la “Federal Food, Drug and Cosmetic Act” un producto alimentario

estaría erróneamente marcado en la etiqueta si la cantidad de grasa *trans* que se encontrara en el control superara en un 20% la cantidad declarada por el fabricante (Mossoba *et al.*, 2009a). Indudablemente, si no se declara contenido de grasa *trans*, pero en la lista de ingredientes aparecen las leyendas “aceite parcialmente hidrogenado”, “aceites o grasas vegetales hidrogenadas” hay que sospechar de la existencia de ácidos grasos *trans*. También puede ocurrir que, por otra parte, atendiendo el consumidor a la posible presencia de grasa *trans*, no se fije en el contenido de grasa saturada; esto lo evita, por ejemplo, con medidas como las recogidas en la legislación canadiense que obliga a declarar en la etiqueta la suma conjunta de ambos contenidos, que no debería superar el 40%, sobre el contenido de grasa total del producto (Skeaff, 2009).

Tal y como fue legislada, la normativa FDA 2003 puede confundir a muchos consumidores y dejaba un resquicio a la industria alimentaria para manufacturar productos alimentarios con cantidades cuantificables de grasa *trans*, declarándoles “legalmente” como “cero-*trans*”. Así, por ejemplo, si se consumieran 5 raciones de un producto declarado “cero-*trans*”, que contuviera 0,4 g de TFA por ración (estaría dentro del marco de la ley FDA 2003), se superaría la ingesta de 1 E% de grasa *trans* recomendada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Hosmer, 2006). Por ello, se ha de ser más realistas y concretos y eliminar el concepto “cero-*trans*”, tal como lo aplica la FDA 2003, para una mayor protección de los consumidores (Brandt, 2011; Erickson, 2006; Moss, 2006).

El 7 de noviembre de 2013, la FDA determinó que los aceites parcialmente hidrogenados ya no se podrían considerar como sustancias GRAS (“generally recognized as safe”); si se aceptaran como aditivos alimentarios, pasada la criba de la solicitud y la memoria aportada por el fabricante a la FDA, tendrían que indicarse dentro de los ingredientes (FDA, 2013). Los Centros para Control y Prevención de la Enfermedad de Estados Unidos lo consideraron como un triunfo de la sanidad pública y estimaron que con esta medida se podían prevenir hasta 20.000 casos de accidentes coronarios por año. Se puede decir que la prohibición de los aceites parcialmente hidrogenados sentó un precedente para que otros constituyentes de los alimentos, como la sal, los azúcares añadidos, las grasas saturadas, y la cafeína estuvieran bajo la lupa gubernamental de la FDA (McCarthy, 2013; Brownell & Pomeranz, 2014).

Después de esta determinación tentativa del 2013, la decisión final de la FDA vio la luz en 2015. Hubo una moratoria de 3 años (período de condescendencia), y a partir de junio del 2018 la industria alimentaria estadounidense tuvo que eliminar el uso de los aceites

parcialmente hidrogenados, principales exponentes de los ácidos grasos *trans* de origen industrial (IP-TFA) y sustituirlos por aceites/grasas más sanas (FDA, 2015). Los fabricantes tuvieron, pues, que prescindir por ley de los aceites hidrogenados parcialmente y reformular sus productos, mediante tecnologías tales como el fraccionamiento o la interesterificación. Se les conminó a que, a ser posible, no usaran aceites tropicales, que cargaban de grasa saturada al producto reformulado, y se emplearan como alternativa o bien aceites-MUFA (alto-oleico), o se optaran por las oleogel, más recientemente. Grandes cadenas de restaurantes y fabricantes de alimentos han reconocido que son capaces de prescindir de los aceites hidrogenados, sin perjudicar el sabor y la calidad gastronómica de los platos, que se sirven, y sin que supongan mucho peso económico.

2.3.1 Nueva York y otras localidades de Estados Unidos

En el 2005 el alcalde de Nueva York, Michael Bloomberg, llevó a cabo una campaña para aprobar una enmienda que permitiera retirar la grasa *trans* de origen industrial (IP-TFA) en todos los locales de restauración de la ciudad. En diciembre de 2006, el Departamento de Salud e Higiene Mental del municipio se sirvió de la aprobación de dicha enmienda para prohibir el contenido a 0,5 g de TFA por ración, en sus restaurantes y servicios de restauración, además de en hospitales, clínicas, centros de días, y otras jurisdicciones locales. Al mismo tiempo, se desarrollaron campañas de educación e información a los consumidores sobre la vigilancia con las grasas *trans* (Aase, 2009; Okie, 2007; Eckel *et al.*, 2009).

El bando de prohibición se programó en dos etapas. En la primera etapa, cuyo plazo expiró en julio de 2007, se garantizó menos de 0,5 g de TFA por ración en aceites, “shortenings” (grasas concretas) y margarinas. En octubre de 2007 se comprobó que el 96% de los restaurantes de la ciudad cumplían con el bando municipal. En la segunda etapa, se exigió a los fabricantes la reformulación en todos los alimentos, para que no se superara la cantidad de 0,5 g TFA por ración. En noviembre de 2008, fecha de entrada en vigor del bando municipal, solo el 1,6-1,9% de los restaurantes neoyorquinos usaban aceites hidrogenados (PHVOs) frente a un 50% de restaurantes que los usaban en 2005 (Mello, 2009).

En un principio, la alcaldía de Nueva York contactó con los responsables de restauración en la ciudad, para que redujeran de forma voluntaria los niveles de grasa *trans*, pero ante la heterogeneidad de comportamientos (muchos restaurantes continuaron usando aceites de cocina

y de fritura con grasa parcialmente hidrogenada) la municipalidad se vio en la necesidad de pasar a la obligatoriedad (Tan, 2009). Se estimó una reducción concurrente del 4,5% de la mortalidad de origen cardiovascular en los años que siguieron a la proclamación de la prohibición municipal (Restrepo & Rieger, 2016).

Las reformulaciones no supusieron un encarecimiento de los productos ni merma de su calidad, debido a que los procesos tecnológicos alternativos (fraccionamiento, interesterificación) tenían un coste comparable al de los procesos tradicionales de hidrogenación (List, 2004). Además, se consumió de forma más saludable: el contenido medio de grasa *trans* en los restaurantes de Nueva York descendió desde aproximadamente 3 g por comida, a menos de 0,5 g por comida (Assaf, 2014). Las consecuencias inmediatas del “efecto Nueva York” se dejaron sentir en los proveedores de comida (“caterings”), tiendas de comestibles y grandes compañías, entre ellas “Kraft Foods”, que asimilaron la inmediatez de las sustituciones en la grasa *trans* (Angell *et al.*, 2009).

Filadelfia y Washington, en 2007, San Francisco en 2008, también emitieron bandos municipales de prohibición de la grasa *trans*; y el mismo camino emprendieron Baltimore, Nueva Jersey y Boston, Montgomery, Albany, Seattle y los Estados de Colorado, California y Puerto Rico. Por ejemplo, en Carolina del Norte y California se requirió por ley utilizar aceites de cocina libres de grasas *trans* en los menús escolares. Sin embargo, existieron algunas resistencias, como es el caso paradigmático de Cleveland. Sus prohibiciones sobre las grasas *trans* fueron bloqueadas por el gobierno de su propio Estado (Ohio); se pleiteó, y el municipio de Cleveland ganó el pleito, y ratificó su bando de prohibición (Assaf, 2014; Coombes 2011; Mozaffarian & Willet, 2007; Angell *et al.*, 2009; Downs *et al.*, 2013).

2.4 Unión Europea

En 2004 la Unión Europea (UE) legisló que si un producto alimentario contuviese aceite parcialmente hidrogenado (PHVO) debe consignarse en la lista de ingredientes de la etiqueta, pero no había que indicar la cantidad de grasa *trans*. Si se declaraba “libre de grasa *trans*” sería obligatorio consignar en la etiqueta las cantidades de grasa saturada, y de grasa mono- y poli-insaturada (Stender & Dyerberg, 2004). En la UE sólo estaba regulada la grasa *trans* en preparados para lactantes, donde su contenido no debía sobrepasar el 3%, sobre grasa total (Directiva 141/2006/CE). En 2010 la Comisión Europea solicitó al Parlamento la propuesta de

limitar al 2% la grasa *trans* de origen industrial (IP-TFA), sobre grasa total, en los productos para consumo humano (EFSA, 2010). La Comisión Europea apeló a los fabricantes para que alcanzaran a cumplir dicha limitación. Esgrimían que una declaración en la etiqueta de menos de 0,5 g de grasa *trans* por ración podría declararse como una declaración nutricional de propiedades saludables, ya que el producto reduce voluntariamente la cantidad de un ingrediente perjudicial para la salud (Unión Europea, 2006).

En 2011 la Comisión Europea debatió sobre los problemas de salud que pueden ocasionar las ingestas de grasa *trans*, y su presencia en los suministros alimentarios (Unión Europea, 2011). Desde esta fecha, la Unión Europea y Suecia establecieron la obligatoriedad de declarar en el etiquetado el contenido de aceite parcialmente hidrogenado (PHVO).

En 2014, la Unión Europea ya puso un mayor énfasis en torno a la problemática de la grasa *trans*, y realizó una síntesis de la evidencia científica hasta ese momento, en el que la FDA se posicionó de manera tentativa para prohibir el uso de los aceites parcialmente hidrogenados (Mouratidou *et al.*, 2014).

Al replantearse la situación en Europa y en el mundo de la incidencia de la grasa *trans*, la Comisión insistió en tener en cuenta especialmente a los grupos de riesgo, sectores poblacionales con problemas cardiovasculares, jóvenes consumidores de “comida rápida”, y los grupos socioeconómicamente más desfavorecidos. Además, la grasa *trans* estaba presente en el diseño del “Plan de Acción Europeo sobre Alimentación y Nutrición 2015-2020”, cuyo objetivo general era mejorar la calidad global de la dieta de los europeos y su estatus nutricional (OMS, 2015).

Tras las presiones gubernamentales y de diversas entidades y asociaciones, la Comisión Europea redactó un informe para el Parlamento y el Consejo, donde se enfatizaba que sería mucho más acertado establecer límites de contenidos de ácidos grasos *trans* en alimentos, como ya hizo Dinamarca, que la obligación de declarar en el etiquetado nutricional los contenidos de grasa hidrogenada, o los contenidos de ácidos grasos *trans* en la etiqueta, como estableció la FDA en 2003 (Ros *et al.*, 2015). Ya hizo hincapié la Comisión en su informe del 2015 que una alta ingesta de grasa *trans* se relacionaba, más que con cualquier otro nutriente, con un elevado riesgo de sufrir cardiopatías. Finalmente, se publicó el Reglamento (UE) 2019/649 (Comisión Europea, 2019) por el que se limita la presencia en los alimentos de las grasas *trans*, que no sean las presentes de forma natural en las grasas (leche, carne) de los animales rumiantes, a un máximo de 2 gramos por cada 100 gramos de grasa en el alimento.

El citado Reglamento entraba en vigor el 15 de mayo del 2019, pero hubo un período transitorio de 2 años, que se cumplió el 1 de abril del 2021, para que las industrias pudieran adaptarse a las nuevas circunstancias. Este Reglamento era directamente aplicable en todos los Estados miembros de la Unión Europea, así como del Espacio Económico Europeo. Afectaba tanto a los alimentos destinados al consumidor final, como a los destinados al suministro de minoristas. Asimismo, estableció la obligación de transmitir información entre los productores sobre los niveles de grasas *trans*, cuando se superase el límite establecido del 2%, sobre grasa total, con el fin de garantizar su cumplimiento en el producto acabado. Esta iniciativa de la Unión Europea se encaminó a conseguir una prohibición completa de la grasa *trans* en 2023. Martín-Saborido *et al.*, (2016) ya demostraron, manejando argumentos económicos, que el establecimiento de un límite legal de grasa *trans* en los productos alimentarios era una opción relevante desde el punto de vista de la sanidad pública.

2.5 Europa

Durante el cuatrienio 1998-2002 el “International Food Information Council” condujo 12 estudios en Europa con el objetivo de evaluar cómo interpretaban y/o usaban la información reseñada en la etiqueta nutricional los consumidores. El 40% respondió que miraban las listas de ingredientes sólo “algunas veces”, y el 17% respondió “nunca”. Sólo el 12% tomaron en consideración la presencia de grasa *trans*, mientras que más de la mitad (53%) no habían pensado ni leído nada acerca de la grasa *trans* (List, 2004). Esto nos puede ilustrar sobre el estado de la cuestión, previo a la aparición de las primeras medidas legislativas tomadas por Dinamarca. En un epígrafe previo ya se ha hecho referencia a este país y a la Unión Europea.

Pocos años más tarde imitaron la legislación danesa otros países europeos: Austria y Suiza, en 2009; Suecia e Islandia, en 2011 (Comisión Europea, 2013). El 4 de diciembre de 2009, el Comité Asesor de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, 2010) dictaminó que las ingestas de grasa *trans* deberían ser lo más baja posible, siempre que se mantenga una dieta adecuada. En 2011, ante la presión social y estimulada por vía gubernamental, los productores de alimentos procesados redujeron de forma voluntaria los niveles de ácidos grasos *trans* (TFAs) en Francia, Alemania y Reino Unido. En este último país, en 2012, fabricantes, supermercados y cadenas de “comida rápida” suscribieron voluntariamente el llamado “Acuerdo de Responsabilidad en Salud Pública”, para eliminar en el procesado, o retirar de la venta, la grasa *trans* de origen industrial; consecuencia directa fue

que se produjo el descenso de las ingestas (0,4% - 0,6%) de TFAs a menos de 1E% (Rippin *et al.*, 2017).

La autorregulación de los fabricantes en los países escandinavos (Noruega, Finlandia) consiguió una reducción de grasa *trans* en los aceites de fritura de los establecimientos de “comida rápida” y que las ingestas descendieran a valores inferiores al 1E% (0,5 E% - 0,8 E%) (Uauy *et al.*, 2009). En Noruega, Finlandia y Países Bajos los esfuerzos cooperativos entre las agencias gubernamentales y las industrias alimentarias consiguieron una reducción de la ingesta, sin aumento en el coste de los alimentos ni merma de su calidad (Aro, 2006). El símbolo o distintivo “Keyhole”, introducido por los países escandinavos, y que distingue a los productos “nutricionalmente más sanos” (bajos en calorías y en azúcares y sal, altos en fibras) se podría aplicar también a los bajos en grasa *trans* (Larsson *et al.*, 1999). Los Países Bajos han conseguido grandes logros desde 2003 a través de la actividad del Grupo de Trabajo neerlandés para la mejora del perfil de ácidos grasos en los alimentos. Este Grupo incluye a los principales proveedores y compradores de aceites y grasas que se emplean en la producción de alimentos procesados. Esta iniciativa resultó muy favorable para impulsar a los fabricantes hacia las reformulaciones (Rippin *et al.*, 2017).

En los países del Este europeo existe un gran vacío legislativo en cuanto a sanciones relacionadas con la grasa *trans* (Polonia, Hungría, Serbia, etc.). Pero en Eslovenia este tema fue objeto frecuente de debate en los medios de comunicación, lo que hizo que el gobierno esloveno presionara a la industria alimentaria para que no usaran grasas parcialmente hidrogenadas, las cuáles descendieron entre 2015 y 2017. Finalmente, las autoridades eslovenas decretaron su prohibición en 2018 (Wilczek *et al.*, 2017; Zupanič *et al.*, 2018).

2.6 España

En 2005, dentro de la estrategia para la Nutrición, Actividad Física y Prevención de la Obesidad (NAOS), implementada por el Ministerio de Sanidad y Consumo para prevenir la obesidad (sobre todo la infantil), se firmaron algunos convenios con industrias alimentarias y empresas de restauración, para la reducción progresiva y voluntaria de la grasa *trans* y ácidos grasos saturados en la elaboración de sus productos, además de incentivar el consumo de raciones más reducidas (Martínez Martín & dePablos Velasco, 2007). Hasta entonces, sólo se había limitado en nuestro país el contenido *trans* en leches infantiles, a menos del 4% sobre

grasa total, siguiendo la Directiva Comunitaria 96/4, de 16 de febrero de 1996, publicada en el BOE como RD 72/1998.

En 2010 la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) recomienda la menor ingesta posible de grasa *trans*, y envía una propuesta al Parlamento Europeo para que solicite a la Comisión un límite del 2% sobre grasa total, del nivel de IP-TFA en los productos alimentarios (AESAN, 2010). La Ley de Seguridad Alimentaria y Nutrición consigna en su articulado un marco legal que establece la reducción del contenido de grasa *trans* en los productos alimentarios (BOE, 2011).

Finalmente, en España se adaptó el 15 de mayo de 2019 el Reglamento (UE) 649/2019 de la Comisión, de 24 de abril de 2019 que modifica el Anexo III del Reglamento (CE) no. 1925/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo. Se refiere a la limitación de la grasa *trans* que no esté presente de forma natural en leche (lácteos) y carne de animales rumiantes, a un máximo de 2 gramos por cada 100 gramos de grasa. Se permitió un período transitorio (hasta el 1 de abril de 2021) para que las industrias pudieran adaptarse a la nueva normativa (BOE, 2019).

2.7 Sudamérica

En la cumbre de Río de Janeiro en 2008 la Organización Panamericana de la Salud (OPS) propuso el lema “las Américas libres de grasa *trans*” (Uauy, 2009), lo que estimuló una actividad legislativa en el Cono Sur americano. Los países del MERCOSUR legislaron eficazmente sobre la obligatoriedad de consignar en el etiquetado la cantidad de grasa *trans* (Brasil, Argentina, Uruguay y Paraguay). En años sucesivos, Méjico, Costa Rica, Colombia (en 2013), Ecuador y Argentina (en 2014), y Perú (en 2018), limitaron el contenido admisible de grasa *trans* de origen industrial al 2%, sobre grasa total, en aceites y margarinas, y al 5% sobre grasa total, en todos los demás alimentos (OMS, 2019). Por su parte, Chile estableció el límite de grasa *trans* al 2%, sobre grasa total, así como información en guías nutricionales para la población, y dentro de su campaña “Escoge vivir sano”, reclamando de esta manera atención específica para bollería y patatas fritas. El Ministerio de Sanidad de Perú resolvió en 2014 que, en aceites vegetales, margarinas y otras grasas los TFAs no debían exceder el 2%, sobre grasa total, ni el 5%, en el resto de alimentos procesados y bebidas no alcohólicas, y pronosticó eliminar la grasa hidrogenada (PHVO) en 2018 (Perú, 2016).

Brasil fue, junto a Dinamarca, Canadá y Estados Unidos uno de los primeros países a nivel mundial en tomar medidas restrictivas. A través de la Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria (ANVISA) decretó en 2003 que en el etiquetado nutricional sólo se podría consignar “cero-*trans*” o “libre de grasa *trans*” si el producto contuviese, como máximo 0,2 g por ración (la misma legislación que en Canadá) (ANVISA, 2003). Se ejercieron presiones gubernamentales sobre la industria para promulgar una reducción voluntaria de TFAs y la búsqueda de alternativas (Monge-Rojas *et al.*, 2011). En 2009, el Ministerio de Educación brasileño aprobó una resolución para limitar la grasa *trans* al 1 E% en los programas de comidas escolares. Para facilitar su implantación, se editó material educacional para los consumidores, y se apoyó la colaboración inter-sectorial. Además, se acometieron vías para eliminar los aceites parcialmente hidrogenados en 2018 (Monge-Rojas *et al.*, 2017).

En 2010 se incorporó una normativa reguladora en el Código Alimentario Argentino en la que, siguiendo el ejemplo de Canadá, se especificaba que el contenido de grasa *trans* en aceites vegetales y margarinas no debía exceder el 2%, sobre grasa total, y el 5% para el resto de los alimentos. El gobierno argentino conminó a los fabricantes a cumplir dicha normativa desde 2014. En el caso de que en los controles se detectase un incumplimiento, se aplicarían las medidas correctoras oportunas. Estas medidas tuvieron bastante influencia en la reducción anual, cuantificada en un 1,3 – 6,3% de accidentes coronarios (Rubinstein *et al.*, 2015). Argentina se volcó en el cultivo, por ejemplo, de plantas oleaginosas alto oleico, una medida para sustituir a la grasa hidrogenada por grasa-MUFA en las reformulaciones (PHO, 2008). El seguimiento de la normativa llegó a ser hasta del 93% en este país, y se estimó que se evitaron 5.373 casos y 1.517 fallecimientos por cardiopatías coronarias agudas (Kakisú *et al.*, 2018).

Los Estados miembros de la Región de las Américas aprobaron por unanimidad, en octubre de 2019, un nuevo plan de acción para reducir las enfermedades cardiovasculares mediante la eliminación de la grasa *trans* de origen industrial en los alimentos, poniéndose como objetivo el año 2025. Las líneas estratégicas de acción propuestas por la Organización Panamericana de la Salud (OPS, 2020) se resumen a continuación:

- Combinar la prohibición (producción y venta) de aceites parcialmente hidrogenados (PHVOs) con la imposición de límites máximos de cantidades de TFAs en alimentos;
- Declaración clara del contenido de grasa saturada, en el etiquetado nutricional;
- Aumento de las medidas de control y monitorización del cumplimiento legislativo;
- Garantías de que los alimentos importados cumplen con la legislación vigente en el país;

- Evaluación del contenido de grasa saturada en productos alimentarios, fuentes importantes de grasas *trans* reformuladas;
- Aumento de las campañas informativas y educacionales sobre los efectos perjudiciales de las grasas *trans*, y los beneficios resultantes de su eliminación;
- Estrategias de comunicación dirigidas a productores, importadores y minoristas de alimentos sobre las nuevas políticas, el marco legal, y posibles alternativas sanas y ventajosas en torno a la grasa *trans*.

2.8 Asia

Empezaremos describiendo la situación de Corea del Sur, donde en 2007 se decretó el etiquetado obligatorio. Según el “Korean Food Code”, del Ministerio de Seguridad, Alimentos y Medicamentos, un alimento se considera “cero-*trans*” si contiene menos de 0,2 g por ración de grasa *trans* (semejante a lo legislado por Canadá). En un control en supermercados, llevado a cabo por la “Korean Food Drug Administration” (semejante a la FDA americana), el 85% de los productos eran “cero-*trans*”. Esto se debía a que los aceites hidrogenados (PHVOs) se sustituían en las reformulaciones por grasa láctea, estearina de palma, interesterificaciones y en el caso de los aceites de fritura, por mezclas de aceites vegetales PUFAs y MUFAs (girasol y soja alto-oleico). En 2013, Irán, que sufría de niveles muy elevados de grasa *trans* en sus abastecimientos alimentarios, estableció el límite máximo en 10% de TFAs, sobre grasa total; sin embargo, más recientemente, lo ha reducido al 2%, en aceites vegetales y margarinas, y al 5% en los demás productos alimentarios (Wanders *et al.*, 2017).

En julio de 2018 las autoridades de Tailandia a través de su Ministerio de Salud Pública prohibían la producción, importación o venta de grasas con aceites parcialmente hidrogenados (PHVOs), y alimentos que los contengan. Las autoridades tailandesas estaban preocupadas por el aumento del consumo de alimentos que las contenían, como margarinas, rosquillas, hojaldres y pasteles, y consumos en franquicias de “comida rápida”, con aceites de fritura no controlados. Ante esta situación los consumidores, fabricantes y agencias gubernamentales mostraron un amplio apoyo a las reformulaciones (Chavasit *et al.*, 2019).

Por su parte China (Ministerio de Sanidad), no publicó hasta enero de 2008 su primera ley sobre la regulación del etiquetado nutricional. A pesar de ello, la información sobre los grupos básicos de nutrientes, como las grasas, era escasa e irregular. En lo que se refiere a los ácidos grasos saturados (SFAs) y a los ácidos grasos *trans* (TFAs), las tasas de etiquetado eran

muy bajas (8,6% para saturadas, y 4,7% para *trans*). Después de examinar 97 de las marcas más populares en el mercado chino, se encontraron niveles por encima del 0,5% de grasa *trans*, sobre grasa total, en el 80% de los productos estilo-occidental, y 33% de productos estilo-chino. Sin embargo, en ninguno de estos productos aparecía en la etiqueta que contuviera grasa *trans*. Con esto se demostraba la necesidad de vigencia de una adecuada legislación sobre declaración obligatoria en el etiquetado (Tao *et al.*, 2011). China prepara un plan de acción que expresa un compromiso con la reducción o la eliminación de la grasa *trans* en sus alimentos (OMS, 2019).

En 2009 la Organización Mundial de la Salud (OMS) organizó un encuentro con países de Oriente Medio y del Maghreb para desarrollar un taller cuyo objetivo era que estos países conocieran mejor las estrategias para la eliminación de la grasa *trans* y sustentaran legislaciones al respecto. Uno de los desafíos que se encontró fue el déficit de laboratorios de control y seguimiento para supervisar el adecuado cumplimiento de las normativas. Ante esta iniciativa de la OMS, varios países del Golfo Pérsico (Arabia Saudí, Bahrein, Kuwait) implementaron regulaciones entre 2016 y 2017. Estos Países colaboraron con las empresas alimentarias para que, de forma voluntaria, eliminaran el uso de aceites parcialmente hidrogenados (PHVOs) en el procesado y manufacturación de alimentos (Li *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2016).

2.9 África

Aunque se está empezando a tomar medidas en algunos países del continente africano, todavía queda mucho por avanzar. La eliminación de grasa *trans* de los alimentos no es una prioridad política para sus gobiernos, lo que supone una seria limitación.

En Sudáfrica el contenido de grasa *trans* no puede exceder del 2% sobre grasa total, en los productos con mayores niveles de grasa *trans*, tanto en los alimentos nacionales como en los importados. Para que un producto se declare “libre de grasa *trans*” debe contener menos de 1 gramo de TFA por 100 g del producto. Es posible que, desde su iniciativa en 2011, haya habido inconvenientes para implementar la normativa; pero, actualmente, Sudáfrica se encuentra entre los países con las mejores prácticas de políticas encaminadas a desterrar la grasa *trans*, al mismo nivel que Dinamarca, Canadá, Estados Unidos y los países escandinavos (OMS, 2019; Rashid *et al.*, 2020).

En Nigeria se creó en 2018 el proyecto NAFDAC para limitar el contenido de grasa *trans* en sus alimentos, y bajo este proyecto limitó estos contenidos a un 2%, sobre grasa total.

Mientras, en Uganda se han realizado controles del etiquetado nutricional para evaluar los niveles de grasa *trans* en los alimentos más populares del país (OMS, 2019).

2.10 India y Pakistán

Como se mencionó con anterioridad, el vanaspati es un aceite fabricado a partir de mezclas de aceites vegetales y aceites parcialmente hidrogenados (PHVOs), que sustituyó en países como India y Pakistán al “ghee” (especie de grasa de mantequilla deshidratada) tanto en el consumo a nivel de cocinado y de frituras, como en el espacio doméstico, comercial, de restauración y de venta callejera. Las autoridades sanitarias de estos países se sintieron alarmadas, cuando conocieron la nocividad de la grasa *trans* de origen industrial (IP-TFA), y los preocupantes datos epidemiológicos de aumento de la enfermedad y mortalidad por accidentes cardiovasculares y diabetes.

Como una primera medida de intervención de choque, la agencia gubernamental “Food Safety and Standards Authority of India (FSSAI)” a través de la “Ley de Prevención y Adulteración de Alimentos” reguló por debajo del 10% TFA el contenido máximo permisible de grasa *trans*. En 2008, se estableció un plazo de 3 años para que vanaspati y los aceites vegetales parcialmente hidrogenados (PHVOs) pasará a contener 5% TFA sobre grasa total (FSSAI, 2010). La citada ley, por otra parte, llegó a proponer, incluso, la presencia de menos de 0,2 g de TFA por ración.

La agencia gubernamental sugirió que en cocinado y fritura se sustituyera el vanaspati por aceites con altos niveles de MUFAs (aceites alto-oleico), en lugar de utilizar para ello aceites tropicales de palma y coco (abundantes y baratos), para así evitar un aumento de la grasa saturada (SFA) en el producto final bajo-*trans* (Kala, 2012; Dows *et al.*, 2013b). En cualquier caso, existen dificultades de tipo técnico y tecnológico, y gran parte de las industrias que fabrican el vanaspati se muestran poco dispuestas a modificar el proceso de hidrogenación, y los hábitos sociales desarrollado durante años (Downs *et al.*, 2013a). No obstante, las agencias gubernamentales han limitado recientemente el contenido máximo de grasa *trans* al 2%, sobre grasa total, en aceites vegetales, vanaspati y grasas concretas (“shortenings”) como parte de su objetivo de liberar sus alimentos de grasa *trans* (Rashid *et al.*, 2020).

En Pakistán la situación es similar a la de la India, con el consumo de vanaspati y otros aceites de cocina parcialmente hidrogenados y, por consiguiente, con un aumento de

cardiopatías en la población. Aunque el gobierno ha introducido ciertas normativas, éstas varían según las jurisdicciones. Además, existe cierta ausencia de credibilidad sobre sanciones efectivas para los que violan las normativas y cierta falta de interés por parte del consumidor. Por todo esto, recientemente Rashid *et al.* (2020), han recomendado que se lleven a cabo:

- Esfuerzos multilaterales entre legisladores, productores y científicos, que conduzcan a una necesaria armonización;
- La sustitución del vanaspati tradicional;
- Esfuerzos de comunicación para cambios de comportamiento, promoción de alternativas al vanaspati y empleo de grasas más sanas, así como un reforzamiento de las capacidades de control por parte de los legisladores.

2.11 Australia y Nueva Zelanda

En los seguimientos anuales desarrollados entre 2005 y 2013 en Australia no se demostró un descenso apreciable de grasa *trans* en los alimentos seleccionados como potenciales fuentes principales de estos isómeros. Se superaba el límite del 2% sobre grasa total, en muchos de ellos, y los niveles eran particularmente más altos en algunos, como horneados, palomitas de maíz y productos de confitería. Pero esta situación cambió en la última encuesta dietética, representativa de la población australiana y neozelandesa, pues sólo el 10 % de la población excedía la ingesta recomendada por la OMS (1 E% de TFA); además, estas ingestas anormales se daban en las capas socioeconómicamente menos favorecidas (OMS, 2019).

Normalmente, el etiquetado del contenido de grasa *trans* en estos países ha sido voluntario, pero con cierto control por parte del consumidor: si se diera alguna reclamación en este sentido, que afectara o incluyera al perfil lipídico o al colesterol, la declaración pasaría a ser obligatoria. En estos países, las cadenas de “comida rápida”, como McDonald’s o Burger King, pueden etiquetar sus alimentos con un logo (señal con un corazón) si cumple rigurosos criterios sobre contenido de calorías, sodio, grasa saturada, o grasa *trans* (Skeaff, 2009).

2.12 Organización Mundial de la Salud (OMS)

En 2004 la Organización Mundial de la Salud, dentro de su estrategia global sobre dieta, educación física y salud, recomendó una ingesta de grasa *trans* que no subiera del 1 E%, lo que, sobre una dieta estándar de 2.000 kcal supondría 2,2 g/p/d (OMS, 2004).

En 2006 los cardiólogos, a través de la “Asociación Americana del Corazón” recomendaron la misma ingesta límite del 1 E% de grasa *trans* (Eckel *et al.*, 2007). Consideraban que incluso bajos niveles de consumo pueden ser nocivos. Así, se demostró que una ingesta de 5 g/p/d (aproximadamente, 2 E% diario) se asociaba con un aumento del 23% de la enfermedad cardíaca isquémica (Mozaffarian *et al.*, 2006).

Como parte de la implantación de la estrategia global sobre dieta, actividad física y salud, la OMS estimuló un diálogo con las principales compañías en el campo de la alimentación y la nutrición para inducirles a que practicasen reformulaciones y alternativas a la grasa *trans* (OMS, 2003).

En 2019 existían límites obligatorios legislados para la grasa *trans* en 28 países, el 31% de la población mundial ese año. De estos 28, 12 países (Estados Unidos, Canadá, Dinamarca, Noruega, Islandia, Austria, Hungría, Letonia, Eslovenia, Chile, Tailandia y Sudáfrica) presentaron las mejores estrategias legislativas (Li *et al.*, 2019; OMS, 2019).

En la Unión Europea, donde se incluye España, la reglamentación de 2019 limita la grasa *trans* al 2% sobre grasa total en todos los productos alimentarios. Pero quedan aún países que no disponen de una legislación adecuada sobre este tema. Entre ellos, muchos países de Europa del Este y de las antiguas repúblicas soviéticas, varios países asiáticos y muchos del continente africano, a excepción de Sudáfrica.

El 14 de mayo de 2018 la OMS y la Organización “Resolve to Safe Lives”, de forma conjunta, anunciaron la iniciativa REPLACE, que se puso como objetivo liberar al mundo de la grasa *trans* en 2023. REPLACE provee a los países de herramientas para que puedan llevar a efecto la eliminación de los ácidos grasos *trans* de origen industrial (IP-TFA) en sus suministros alimentarios. Se considera la primera iniciativa global para deshacerse de un importante factor de riesgo de las enfermedades cardiovasculares. El mapa de ruta de REPLACE se diversifica en seis campos de acción (Ghebreyesus & Frieden, 2018):

- **REview**: revisar las fuentes dietéticas de la grasa *trans* de origen industrial (IP-TFA);

- *Promote*: Promover la sustitución de aceites parcialmente hidrogenados (PHVOs) por grasas y aceites más saludables;
- *Legislate*: Legislar iniciativas de regulación;
- *Assess*: Controlar y monitorizar el contenido de grasa *trans* en los suministros alimentarios y los cambios en las ingestas poblacionales;
- *Create*: Crear una concienciación sobre el impacto negativo para la salud de la grasa *trans* entre las políticas, productores, distribuidores, y público en general;
- *Enforce*: Imponer el cumplimiento de las medidas legislativas.

En abril de 2019 el Dr. Ghebreyesus, director general de la OMS, y científico en el campo de las grasas *trans* en su país, solicitó a las industrias alimentarias la reformulación universal de sus alimentos para desterrar definitivamente el uso de aceites vegetales (o de pescado) parcialmente hidrogenados (OMS, 2019).

Ese mismo año el grupo de empresas pertenecientes a la “International Food and Beverage Alliance (IFBA)” se comprometió a que aceites y grasas producidos industrialmente no deberían superar los 2 g de grasa *trans* por cada 100 g del producto en 2023. Para tratar de alcanzar este objetivo la red de empresas “Scaling Up Nutrition (SUN) Business Network” se comprometió a aportar fondos y brindar soporte técnico a pequeñas y medianas empresas para la reformulación adecuada de los productos implicados (IFBA, 2019).

¿Cuáles son los desafíos e inconvenientes que planteó la OMS para eliminar universalmente la grasa *trans*, fijándose en el año 2023 como objetivo? ¿Qué recomendaba para tratar de superar estas limitaciones? La OMS se fijó en tres situaciones de déficits:

- **Déficit de capacidad reguladora:**

Como las políticas a emprender para eliminar eficazmente la grasa *trans* de los suministros alimentarios debieran ser aplicables y sostenibles en países con limitaciones de recursos humanos y financieros, esto podría constituir un problema. Muchos países tienen aún importantes sectores alimentarios que no están regulados. La OMS ha elaborado un plan de acción de capacitación para el desarrollo de las medidas políticas necesarias.

- **Déficit de laboratorios y equipos de control:**

En 2019 la OMS publicó una serie de protocolos para que sirvieran de ayuda a los laboratorios de control de las grasas *trans*. Los laboratorios requieren a menudo apoyo financiero y técnico adicional.

- **Déficit de datos precisos y fiables:**

Muchos países no poseen datos sobre los niveles de ácidos grasos *trans* (TFAs) en sus alimentos, o datos sobre sus ingestas poblacionales. Sin datos, la eliminación de TFAs, a menudo, no se considera un tema prioritario para invertir tiempo y recursos. La OMS apoyaría el diseño y la realización de estudios, con la intención de crear bancos de datos sobre el contenido de grasa *trans* en los alimentos nacionales, como acción prioritaria para promover dietas más saludables (OMS, 2019).

En 2018, 45 países, la mayoría países desarrollados, habían tomado decisiones efectivas para reducir la grasa *trans* de origen industrial (IP-TFA), incluyendo:

- Etiquetado voluntario u obligatorio;
- Auto-regulación en los productores;
- Directrices para fabricantes y consumidores;
- Restricciones legislativas o prohibiciones.

Sin embargo, gran parte de la población mundial estaba desprotegida ante la presencia de la grasa *trans*, y la mayor mortalidad se asociaba a países pobres, o en vías de desarrollo (Ghebreyesus & Frieden, 2018). La mayoría de estos países tienen que implementar decisiones políticas nacionales. Como alternativas a los aceites parcialmente hidrogenados se han investigado y usado aceites alto-oleico y grasas técnicas (ceras, oleogeles). La condición esencial es que no se produzca un aumento sustancial en el contenido de grasa saturada, y no se deben alterar las propiedades funcionales, reológicas y sensoriales, ni producirse un descenso de la disponibilidad o un incremento significativo de los costes: solo el corazón notaría la diferencia.

CAPÍTULO 3:

Determinación de grasa *trans* por el método espectroscópico ATR-FTIR (-2D) de segunda derivada en margarina reformulada

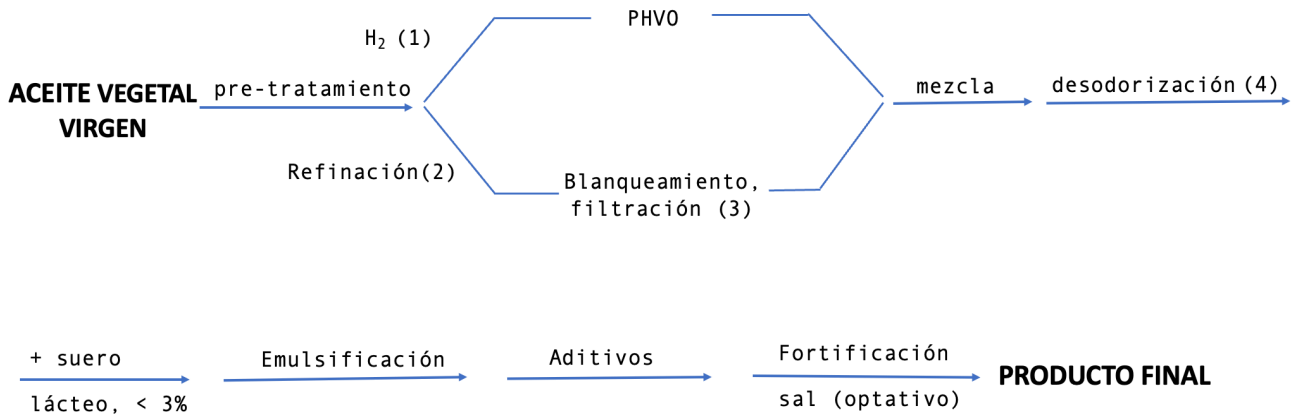
Capítulo 3: Determinación de grasa *trans* por el método espectroscópico ATR-FTIR (-2D) de segunda derivada en margarina reformulada

3.1. Introducción

La margarina es un producto alimentario que consiste en una emulsión del tipo agua/aceite, de cristales de grasa sólida en una fase acuosa de gotitas minúsculas, grasas vegetales, que puede contener leche en una cantidad no superior al 3,3%, sobre el contenido de grasa total. Los cristales de grasa sólida, que suministran dureza y textura, se disponen bajo las formas polimórficas α , β' , β , en orden de estabilidad, pero se prefiere la forma β' porque no comunica granulosidad a la margarina (European Council, 1999). En el Código Alimentario Español (CAE) se autorizaba en la fabricación el empleo de grasas hidrogenadas alimentarias, obtenidas por un proceso de hidrogenación catalítica de grasas naturales refinadas comestibles (CAE, 1997). La margarina podía contener como ingredientes adicionales:

- Emulsificadores, como lecitina (E-322) y mono- y diglicéridos;
- Reguladores del pH, como los ácidos cítricos (E-330) y láctico (E-270), o sus sales, que evitan sabores ácidos o amargos;
- Ácido sórbico (E-200) o sorbato potásico (E-202), como antimicrobianos o antifúngicos;
- β -caroteno, retinol, clorofilas, que adecúan el color amarillento, y son pro-vitamina A;
- Suero lácteo, en el rango 0 - 2,5%;
- Sal común, rango 1 – 3,2% si es salada (0 – 1%, no se considera salada).

En la Figura 6 aparece un esquema del proceso de fabricación de la margarina.



- (1) Se reducen ácidos grasos esenciales (EFAs). Se forma grasa saturada, e isómeros posicionales y geométricos (TFAs).
 (2) (3) Se eliminan ácidos grasos libres, impurezas, metales, pigmentos y malos olores. Se pueden formar CLAs.
 (4) Se eliminan componentes del *flavor* y volátiles malolientes. Se pueden formar dímeros y polímeros.

Fig. 6. Esquema tradicional de la fabricación de la margarina.

Las operaciones que se llevan a cabo podemos resumirlas en las siguientes etapas:

- 1.^a) Recepción y almacenado de los ingredientes y aditivos empleados en la fabricación;
- 2.^a) Pesaje y dosificación de los ingredientes;
- 3.^a) Refinado:
 - Neutralización: elimina acidez,
 - Re-refinado: elimina jabones,
 - Centrifugación entre lavado y secado,
 - Desodorización: elimina volátiles (malos olores);
- 4.^a) Mezcla del aceite refinado con agua y aditivos y posterior homogenización;
- 5.^a) Enfriamiento-cristalización;
- 6.^a) Envasado-empaquetado;
- 7.^a) Almacenamiento frigorífico.

Las margarinas se clasifican en:

- De mesa, doméstica, casera: 80% grasa;
- Grasa untable, sustancia grasa para untar: 62-80% grasa;
- Margarina $\frac{3}{4}$: 60-62% grasa (60% grasa, 40% agua);
- De mesa PUFA: $\geq 40\%$ PUFA y $\leq 20\%$ SFA;
- Baja en grasa: 25 a $< 60\%$ grasa;
- Sin sal, con sal;
- Blanda (“soft”): $\approx 30\%$ PUFA, poco SFA y poco PHVO, untables a 4 °C, poca plasticidad a 21 °C;
- Dura (“hard”): 18-25% PUFA, alto SFA, presencia de PHVO, no untables a 4 °C, plásticas a 21 °C.

El mercado global de la margarina espera alcanzar los 3.000 millones de dólares en 2026 debido, sobre todo, a la expansión de las industrias de panadería/bollería/pastelería, donde el papel de la margarina es fundamental para otorgar propiedades esenciales, tales como emulsificación, aireación y lubricación. También hay que tener en cuenta a nivel mundial el crecimiento de los consumidores veganos que optan por la margarina en lugar de la mantequilla, y el consumidor habitual, que ahora vuelve a confiar en un producto reformulado cero-*trans* (Silva *et al.*, 2021).

En 1866 el gobierno francés promovió un concurso para descubrir un producto apropiado para reemplazar a la mantequilla que tuviera un precio más asequible y que se pudiera conservar. En 1869 el farmacéutico Mège-Mouriès (1817-1880) ganó el concurso, y al producto lo denominó “margarina” (etimológicamente, del griego “margarit”, que significa “perla”). Se postuló como una alternativa ventajosa al uso de mantequilla, por su ausencia de colesterol, bajo contenido de grasas láuricas y alto contenido de PUFAs (Craig-Schmidt, 2006; Van Alphen, 1964). En 1871 compró la patente el fundador de Unilever, Jurgens-Van de Bergh (Morris & Vaisey-Genser, 2003). Este producto presentaba una consistencia untuosa, era digestivo y económico.

Durante los primeros tiempos se empleó en la fabricación sebo de bovino, curiosamente, pero ante la precariedad del sebo, se intentó conseguir un producto graso semifluido, a través de un proceso de hidrogenación parcial de aceites vegetales comestibles refinados, proceso

puesto a punto por Normann en 1902 (Van Alphen, 1964). Los aceites vegetales parcialmente hidrogenados (PHVO) fueron introducidos en USA en 1920 (Albers *et al.*, 2008). En un principio se creían una opción más sana que la grasa animal. Desde el punto de vista tecnológico, eran bien aceptados, al presentar un punto de fusión adecuado para fundir en boca, intermedio entre los puntos de fusión de los ácidos grasos saturados (SFA) y los insaturados (MUFA), no ofrecían regusto ceroso y constituían emulsiones plásticas fácilmente extensibles. Pero a partir de la década de 1980s los investigadores se dieron cuenta de que la presencia de grasa parcialmente hidrogenada (PHVO) era la principal fuente industrial de grasa *trans* (ácidos grasos *trans*, TFA), que presentaban efectos nocivos para el sistema cardiovascular y otras posibles dolencias. Las grasas *trans* (TFA) eran más colesterolémicas que el ácido láurico (Kinsella *et al.*, 1981).

En 1995, en países como Escocia y Noruega, se alcanzaban valores muy altos de TFA en sus margarinas, sobre todo, debido al uso de aceites de pescado parcialmente hidrogenado (PHFO) en la elaboración de sus margarinas, lo que sumaba un 13,9% de *trans*-20:1 y un 7,5% de *trans*-22:1. Cuando se eliminó esta práctica, en 1998, los índices de *trans*-20:1 y de *trans*-22:1, pasaron a ser muy bajos (0,1% TFA). Se demostró que los aceites hidrogenados de pescado inducían mayores niveles de TFA que los aceites vegetales hidrogenables. Los aceites hidrogenados de pescado resultaban más económicos, pero podían contener hasta un 50% incluso de *trans* de PUFAs de cadena larga, como *trans*-20:1 y *trans*-22:1 (Almendingen *et al.*, 1995). El consumo de margarinas fabricadas a partir de aceites de pescado hidrogenados aumentaba significativamente la ratio LDL-C/HDL-C, en comparación con la de una margarina fabricada a partir de una cantidad iso-calórica de aceite parcialmente hidrogenado de soja (Ascherio, 2006).

En este Capítulo de la Tesis, se aborda la determinación de los niveles totales de grasa *trans* (en un 95-100%, *trans* – 18:1) en margarinas reformuladas del mercado español. Se emplea el método ventajoso, sobre la cromatografía de gases, de la espectroscopía infrarroja ATR-FTIR (-2D) de segunda derivada oficializado por la “American Oil Chemists’ Society” (AOCS, 2009) como Cd 14e-09, que fue validado por estudio colaborativo inter-laboratorio internacional en 2011 (Mossoba *et al.*, 2011).

3.2. Material y Métodos

3.2.1 Reactivos

- Trielaidina (TE) [1,2,3-tris(*trans*-9-octadecenoato) de glicerilo]. Se conserva en congelador (-20 °C), hasta el momento de su uso. Banda de absorción destacada a 966 cm⁻¹ en el espectro ATR-FTIR (-2D) de TE puro (pureza > 99%, Sigma-Aldrich);
- Tripalmitina (TP) [1,2,3-tris (hexadecanoato) de glicerilo]. Se conserva en congelador (-20 °C), hasta el momento de su uso. Banda de absorción destacada a 956 cm⁻¹ en el espectro ATR-FTIR (-2D) de TP puro (pureza > 99%, Sigma-Aldrich).

Hasta 2007, para el calibrado se empleó la mezcla de estándares trielaidina-trioleína (TO). Pero en dicho año se descubrió cromatográficamente que la trioleína comercial presentaba un 0,5% de trielaidina como impureza. Entonces se optó por la tripalmitina (TP) como sustituyente de la trioleína, ya que era el reactivo *cero-trans* más favorable entre los eligibles por presentar una banda de absorción de menor extinción y más alejada de 966 cm⁻¹, la banda *trans* (Tabla 6). Además, la tripalmitina era más asequible comercialmente que la triaraquidina (Mossoba *et al.*, 2011).

Tabla 6. Características espectrales de los posibles estándares *cero-trans*.

Estándar	Configuración	Máximo de absorción (cm ⁻¹)	Extinción específica
Trilaurina	12:0	960	mayor
Trimiristina	14:0	962	mayor
Tripalmitina	16:0	956	menor
Triestearina	18:0	960	mayor
Triaraquidina	20:0	958	menor

- Sulfato sódico anhidro (Merck);
- Papel de filtro circular hidrófobo Metrical UM-1, de tamaño de poro 5 µm (Gelman Instruments, Co.), adaptado a embudo Büchner.

3.2.2 Aparatos

- Espectrofotómetro infrarrojo Jasco FTIR-4200 A (Japón), con banco óptico compuesto por interferómetro de Michelson, monocromador con sustrato de bromuro potásico, y detector del sulfato de triglicina deuterado (DTGS), que consigue la mejor linealidad. Se aplica el software QAU-400 Quantitative Analysis Program (Jasco Analytica, Japón), para manejo de los datos ATR-FTIR (-2D) de segunda derivada.
- Baño de agua termostatzado con agitación Selecta, fijado a 70 °C, para disolución de las mezclas estándares del calibrado, y a 47 ± 2 °C, para las muestras de margarina.
- Embudo Büchner acoplado a Kitasato, y bomba de vacío Vacuubrand mpd. Membranvakuumpumpe.
- Agitador Vortex Ika. Genius 3, mod VG3.
- Balanza de precisión Precisa Gravimetric AC, CH-Dietikon (Swiss Made).
- Viales de vidrio Pyrex de 10 ml y 20 ml, con tapón de rosca.
- Micropipeta de 1-10 μ L.
- Pipetas Pasteur.

3.2.3 Muestras

- **Muestra de margarina A.** Declara en el etiquetado aceites vegetales y grasas vegetales, leche desnatada y sal (0,9%). 60% p/p de grasa, de la que 30% es saturada, 40% ácido linoleico, y 5% ácido α -linolénico. Se trata, por tanto, de margarina $\frac{3}{4}$ (60 – 62% grasa), sin sal (0 – 1% NaCl), y podría considerarse blanda (45% PUFA). No menciona contenido de grasa *trans*. Declara 10 g como ración. Está dentro de la fecha marcada de caducidad. Se conserva en frigorífico (4 °C).
- **Muestra de margarina B.** Declara en el etiquetado aceites y grasas vegetales, lactosa y proteínas de leche y sal (1,5% salada) 79% p/p de grasa, de la que 45,7% es saturada. Se trata de materia grasa para untar (62-80% grasa). Se podría considerar semi-blanda. En el etiquetado menciona un contenido de ácidos grasos *trans* (TFA) menor de 0,5 g por ración. Declara 10 g como ración. Está dentro de la fecha marcada de caducidad. Se conserva en frigorífico (4 °C).

Ambas margarinas fueron suministradas por un proveedor comercial. En el espectro ATR-FTIR (-2D) de ambas margarinas se distingue claramente un máximo de banda a 962-966 cm^{-1} . No se observa un ancho de banda grande ni asimétrico, como podría aparecer para niveles de TFA mayores del 1%, sobre grasa total.

3.2.4 Procedimientos

a) Recta de calibrado

Se preparan muestras estándares para el calibrado del método, mezclando TE y TP, pesando, en balanza de precisión (0,3 – x) g de TP y x g de TE, en viales de vidrio Pyrex de 10 mL, donde x es igual a 0,0007 g, 0,0010 g, 0,0015 g, 0,0030 g, 0,0062 g, 0,0155 g, 0,0227 g y 0,0301 g, para preparar porcentajes de TE (TFA) de 0,22, 0,34, 0,50, 1,00, 2,07, 5,17, 7,60 y 10,03 por ciento, respectivamente. Los viales de vidrio conteniendo los niveles estándares y tapados se llevaron a un baño de agua termostatzado a 70 °C, con agitación hasta fusión de los reactivos mezclados. Se retiran entonces los viales del baño de agua, y se agitan para homogenizar con un agitador Vortex, antes de llevarlos a la celda de medida del espectrofotómetro IR.

b) Muestras de margarina

Se pesaron aproximadamente 8 g de muestra de margarina en viales de vidrio Pyrex de 20 mL, con tapón de rosca. Las muestras se llevaron a baño de agua, con agitación, termostatzado a 47 ± 2 °C, durante 5 – 7 minutos, hasta fusión. Se provoca la desestabilización y rotura térmica de la emulsión. El punto de ablandamiento de la margarina está entre 33,1 °C y 37,4 °C, y a 40 °C, el contenido de sólidos es prácticamente 0%. Se sacan las muestras del baño de agua, y se homogenizan con un agitador Vortex. Se dejan decantar las fases. Con pipeta Pasteur se toman volúmenes de la fase oleosa superior. Se depositan sobre papel filtrante circular hidrófobo, espolvoreado con Na_2SO_4 anhidro, acoplado a un sistema embudo Büchner-Kitasato-bomba de presión a vacío. Con la filtración se elimina la humedad y los sólidos residuales (sal, cuajada). La fase oleosa filtrada se trasvasa del Kitasato a un vial de vidrio de 10 mL, del que se toman 1 – 10 μL para la medida en el espectrofotómetro IR.

c) Procedimiento espectrofotométrico ATR-FTIR (-2D) de segunda derivada

1 – 10 μL de la mezcla de calibrado, o de la fase oleosa de margarina, se depositan y se extienden sobre el cristal ATR (diamante/ZnSe) cubriendo totalmente su superficie. La temperatura no debe estar fuera del rango 20 – 40 $^{\circ}\text{C}$, ya que el cristal ATR es muy sensible térmicamente, y podría explotar (Mossoba *et al.*, 2009 b). Si ha solidificado parcialmente la muestra a medir se pulveriza y homogeniza en mortero de ágata y luego se esparce uniformemente sobre la superficie del cristal ATR. No es imprescindible que la muestra esté fundida. Cuando se pasa del estado líquido al estado sólido, sucede:

- Pequeño aumento de absorbancia;
- Estrechamiento del ancho de banda espectral;
- Desplazamiento espectral hipsocrómico desde 966 cm^{-1} hasta 963/961 cm^{-1} .

Pero la exactitud de la medida no se afecta, puesto que el pequeño aumento de absorbancia se compensa con la disminución del ancho de banda.

Antes de la medición se co-adicionan 64 bandas, para mejorar la ratio señal-ruido (SNR), y poder detectar niveles de grasas *trans* inferiores a 1-2 %, sobre la grasa total. Entre medidas consecutivas es importante la limpieza del cristal ATR, para evitar el conocido “efecto de memoria”. Para ello se debe proceder de la siguiente forma:

- Retirar suavemente de la superficie del cristal ATR la muestra que se ha medido utilizando papel tisú absorbente libre de hebras.
- Colocar unas gotas de *n*-hexano sobre la superficie del cristal ATR, uniformemente, y retirar presionando suavemente con papel tisú.
- Disponer 1 – 2 μL de la nueva muestra, y proceder a la medida.

Desde la fuente, la luz IR penetra unos pocos micrómetros en el interior de la fase oleosa, después de atravesar el cristal ATR (Figura 7). Al pasar desde un medio con alto índice de refracción (cristal ATR) a otro de menor índice de refracción (fase oleosa), en vez de transmitirse experimenta una reflexión interna, con un ángulo de incidencia mayor que el ángulo crítico. La intensidad de absorción de la onda de radiación IR decae con el paso de luz (fijo) y debido al porcentaje de radiación que absorbe la grasa. Se produce un interferograma que posteriormente, por transformada de Fourier, pasa a espectro de rayo único. Se define el espectro de absorción IR frente al aire como fondo espectral de referencia. Como el tamaño del paso de luz efectivo es muy pequeño, se pueden ensayar tamaños de muestra muy pequeños

(1 – 10 μL), sin necesidad de utilizar ningún disolvente volátil y tóxico y en unos 5 – 7 minutos (Mirabella, 1992; Mossoba *et al.*, 2007; Mossoba *et al.*, 2009 a).

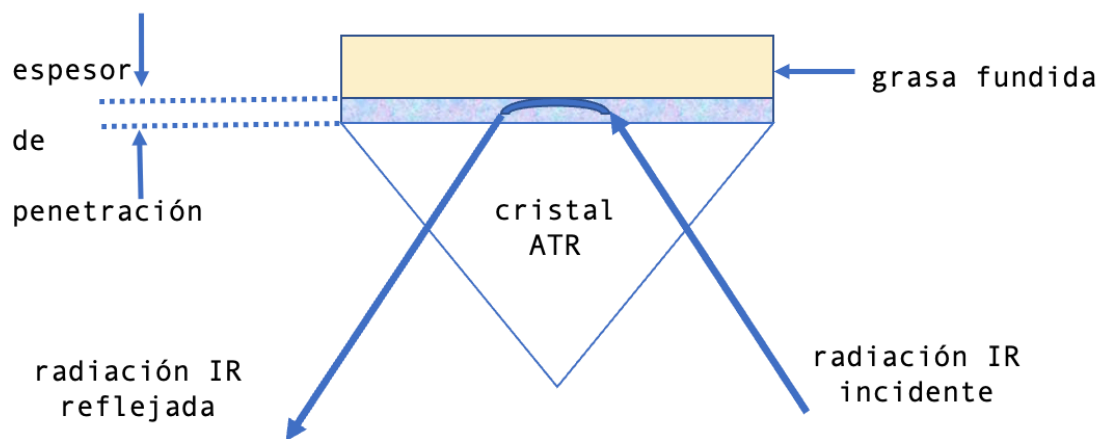


Fig. 7. Penetración por cristal ATR: reflexión total atenuada.

Los espectros ATR-FTIR se acumularon en el rango de número de onda $4.000 - 600 \text{ cm}^{-1}$, con una resolución espectral de 4 cm^{-1} . Para el procedimiento de segunda derivada ATR-FTIR (-2D) se empleó una extensión espectral con un rango $1.070 - 830 \text{ cm}^{-1}$. Se multiplica por (-1) de forma convencional, con el propósito de que las bandas de absorción se dirijan hacia arriba en los espectros. Las condiciones experimentales empleadas son las mismas cuando se procede a la calibración del método que cuando se miden las muestras de margarinas.

3.2.5 Análisis estadístico

Los resultados se expresaron al 0,01% más cercano. Se ofrece la media y la desviación estándar (SD), sobre 6 replicados de cada tipo de margarina. Se llevan a cabo la prueba t-Student, para $n_1=n_2$ y $\sigma_1^2=\sigma_2^2$ (n = número de replicados; σ^2 =varianza), y la prueba F de Fischer para el cociente de varianzas, considerando significativo para $p \leq 0,05$. Se hizo uso del software SPSS Statistics v.20 (SPSS Inc., Chicago).

3.3 Resultados

En la Figura 8, con fines ilustrativos, se muestra el espectro ATR-FTIR de segunda derivada para una mezcla trielaidina-tripalmitina, con un nivel trans de 40,15% como porcentaje de grasa total. Se distingue netamente la banda *trans* sobre las demás bandas en el espectro (banda 8). Conforme descende el porcentaje de TE en la mezcla se observa un desplazamiento espectral hipsocrómico e hipocrómico, que desplaza el máximo de absorción desde 966 cm^{-1} hasta $963/961\text{ cm}^{-1}$. Este hecho, que fue confirmado por Mossoba *et al.*, (2007), ya fue descrito por varios autores (Jart, 1960; Hatt & Lamberton, 1955; Franko *et al.*, 1994; Mitcham *et al.*, 1973; Yu *et al.*, 2008).

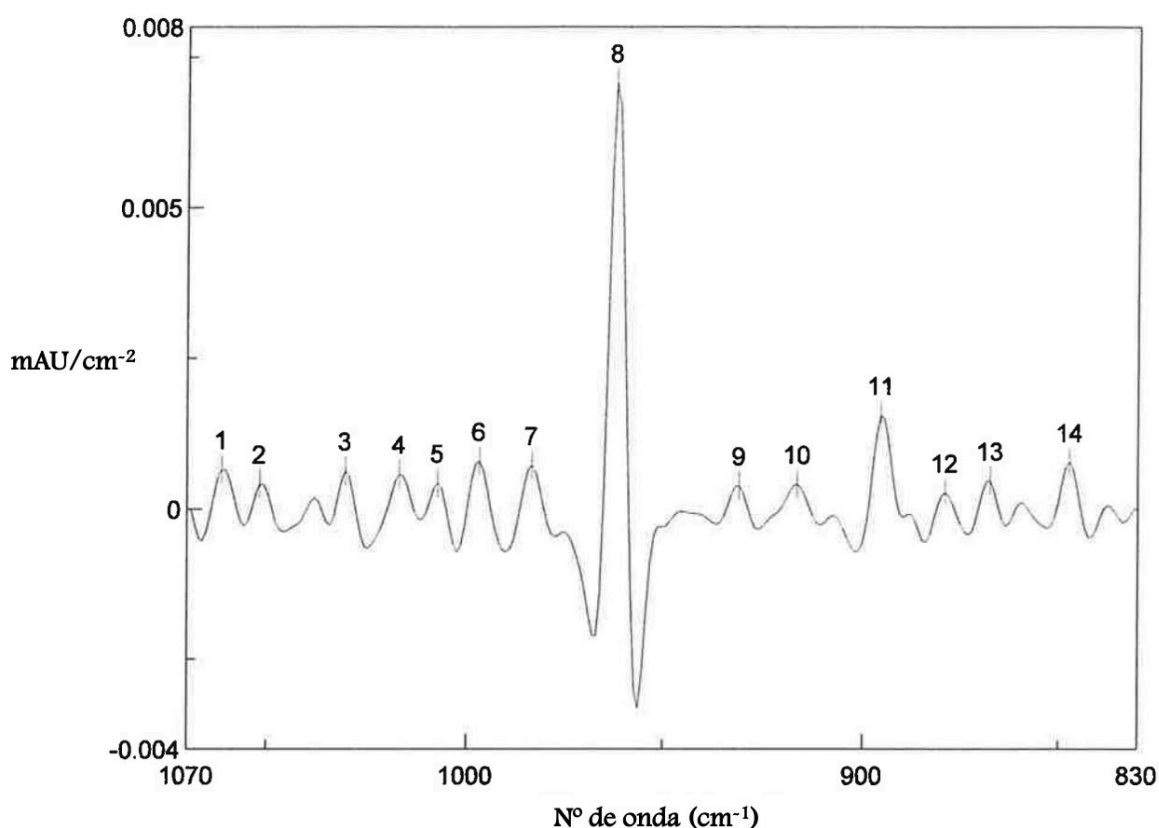


Fig. 8. Región del espectro que exhibe la banda de deformación del doble enlace trans, en escala expandida para el espectro de segunda derivada negativa, para una mezcla trielaidina-tripalmitina, con un nivel trans de 40,15% (pico 8), como porcentaje sobre grasa total. La altura de la banda de la segunda derivada negativa puede medirse exactamente, para cualquier muestra que se ensaye, a partir de la misma línea-base horizontal ($Y=cero$). Se observa cómo no hay solapamiento de la banda trans con las bandas colindantes.

A partir de la representación de altura de banda ($\text{mAU}/\text{cm}^{-2}$) vs porcentaje de TE en la mezcla TE-TP, que representa %TFA, sobre grasa total, se obtiene una función de calibración lineal ($y = 0,1479x + 0,1635$; Figura 9).

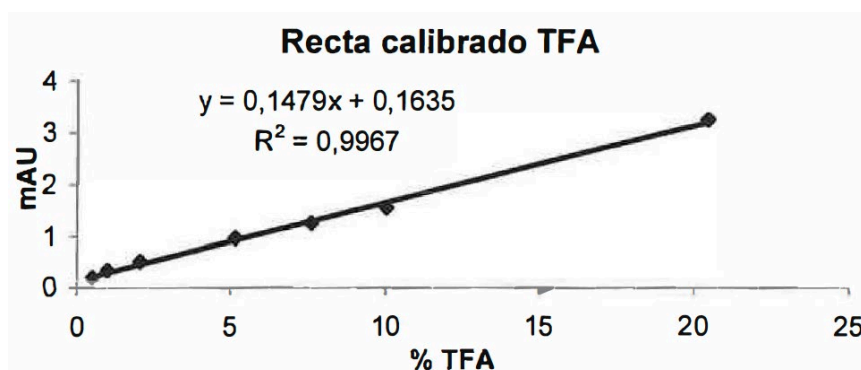


Fig. 9. Recta de calibración construida a partir de las mezclas estándares tripalmitina-trielaidina mediante el método ATR-FTIR de la segunda derivada. El porcentaje (%) de trielaidina en la mezcla binaria marca el nivel (%) de ácidos grasos trans (TFA), sobre grasa total.

Se obtiene un coeficiente de correlación lineal muy próximo a 1 ($R^2 = 0,9967$), lo que confirma una sólida concordancia entre los valores de ordenadas y abscisas. El nivel de ruido observado para la línea-base en los espectros de calibración fue $0,01 \text{ mAU}/\text{cm}^{-2}$. Como la ordenada correspondiente al nivel (%) de TE más bajo ($0,22\%$) en la mezcla de calibración TE-TP fue $0,19 \text{ mAU}/\text{cm}^{-2}$, la ratio señal-ruido (SNR) era de 19:1 ($0,19/0,01$), mayor de 10:1, luego satisfactoria para el uso del detector DTGS (Mossoba *et al.*, 2011).

En los espectros ATR-FTIR (-2D) de las margarinas se aprecia claramente la banda característica de los TFA ($966 - 961 \text{ cm}^{-1}$). Esta banda no se observa ni en los ácidos grasos saturados, ni en los *cis*-insaturados. Aparecen bandas próximas asignables a los ácidos linoleicos conjugados (CLAs) (985 cm^{-1} y 945 cm^{-1} , para *cis*, *trans*- y *trans*, *cis*-CLA; 990 cm^{-1} para *trans*, *trans*-CLA), que no interfieren salvo que su nivel fuera superior al 1%, caso que aquí no se da [los CLAs son característicos de los TFAs procedentes de leche (lácteos) y carne de animales rumiantes]. En el mundo vegetal, únicamente el aceite de ricino, debido a la presencia de grupos -OH, podría modificar la intensidad de vibración de deformación fuera del plano del enlace C-H *trans* (Jart, 1960).

Sustituyendo en la ecuación de regresión $y = 0,1479x + 0,1635$ el valor de la ordenada por la altura de banda ($\text{mAU}/\text{cm}^{-2}$) obtenida en la medición espectrofotométrica al número de onda de máxima absorción *trans* de ambos tipos de margarina (A y B), y despejando “x”, se consigue saber el porcentaje (%) de TFA (grasa *trans*), sobre el contenido de grasa total (Tabla 7). En la misma Tabla aparecen las cantidades en gramos de grasa *trans* por 100 g del producto y por ración del producto. Aunque en el envase se considera 10 g el tamaño de ración, se ha optado por 15 g, que se acerca más al promedio de las margarinas, y a la porción de cafetería (Requejo & Ortega, 2009).

Tabla 7. Contenido de grasas trans de las margarinas ensayadas (Galvin et al., 2016).

Descripción (número de replicaciones)	Total grasa (g/100 g margarina) ^a	Grasa trans (g/100 g grasa total) ^b	Grasa trans (g/100 g margarina)	Grasa trans (g por ración) ^c
Margarina blanda (n=6)	60	0,21 ± 0,22	0,126	0,019
Margarina dura (n=6)	79	0,33 ± 0,20	0,261	0,039

^a Declaración etiqueta;

^b Media ± SD;

^c 15 g de margarina.

La precisión establecida para este método oficial ATR-FTIR (-2D) fue de 0,5% TFA, sobre la grasa total (Mossoba et al., 2011). Los niveles de TFA (%) encontrados para estas margarinas “cero-trans” están por debajo de este límite, con lo que la desviación estándar es alta; pero podemos considerar, o establecer, un rango confiable. Así, en cuanto a su contenido de TFA, el rango para la margarina A sería de aproximadamente de 0 – 0,4 % TFA mientras que para la margarina B sería de 0,1-0,5% TFA sobre grasa total. Por las características presentadas, se podría considerar a la margarina A como margarina blanda, y a la margarina B como semiblanda (20 – 40% de ácido linoleico) (Larqué et al., 2003).

3.4 Discusión

Las margarinas ensayadas son “cero-*trans*”. La margarina blanda no hace mención alguna en el etiquetado a contenido alguno de grasa *trans*. La margarina semiblanda declara en el etiquetado un contenido de grasa *trans* inferior al 0,5%, sobre la grasa total, y como declara 79% de grasa, esto supondría menos de 0,63 g de grasa *trans* por 100 g de margarina. En el ensayo realizado se determinó un contenido de aproximadamente 0,27 g de TFA por 100 g del producto (Tabla 7). De aquí se deduce que es correcta la declaración comercial.

Habría que considerar si los equivalentes de retinol añadidos para el enriquecimiento legal de las margarinas pueden interferir en la determinación de los TFAs, debido a las bandas *trans* características a 964 cm⁻¹ y 966 cm⁻¹ de beta-caroteno y retinol. El contenido de equivalentes de retinol de las margarinas es, como promedio, de 900 µg por 100 g del producto, o sea, aproximadamente, 0,001% sobre la grasa total (Moreiras *et al.*, 2011). Por lo tanto, el contenido de equivalentes de retinol es de 210 a 330 veces inferior al contenido de TFA calculado, y no causa interferencias.

Cuando se aplicaron las pruebas estadísticas (t-Student, F-Fischer) no se dedujo diferencias estadísticamente significativas entre los niveles promedio de %TFA de las dos margarinas (p>0,05), ambos con niveles inferiores al 0,5% de TFA, sobre grasa total.

El índice aterogénico ($AI = (SFA + TFA) / (MUFA + PUFA)$) adquiere valores menores de la unidad en ambas margarinas (0,43, para la blanda; 0,84 para la semiblanda) favorable para el sistema cardiovascular (los ácidos grasos láurico y mirístico, y la grasa *trans* son aterogénicas, mientras que los ácidos grasos insaturados, MUFA y PUFA, son anti-aterogénicos). Esto está de acuerdo con los datos de Burdaspal *et al.*, (2010), que ofrecía valores para este índice de 0,3-0,6, en margarinas españolas, y contrasta grandemente con los valores por encima de la unidad (aterogénicos) en margarinas de países del Este Europeo (Vučić *et al.*, 2015).

3.4.1 Límites de grasa *trans*

¿Cuáles serían los límites permisibles de grasa *trans* para considerar “cero-*trans*” una margarina? Esto dependerá de la legislación al respecto del país considerado. Si tenemos en

cuenta las legislaciones en este sentido de EE. UU., Canadá y Dinamarca, y considerando las raciones de 15 g, tendríamos:

- En EE. UU.: $(0,5/15) \cdot 100 = 3,3\%$ de TFA, sobre el peso neto;
- En Canadá: $(0,2/15) \cdot 100 = 1,3\%$ de TFA sobre el peso neto;
- En Dinamarca: 1% TFA, sobre la grasa total, y considerando 80% de grasa, 1,25% de TFA sobre peso neto.

Como se puede comprobar (Tabla 7), las margarinas ensayadas cumplen con esta condición, para las tres legislaciones.

Si la ingesta energética diaria procedente del consumo de grasa *trans* aumenta del 0,9 E% al 2,1 E%, el riesgo de enfermedad cardiovascular se incrementará en un 30% (Mozaffarian *et al.*, 2006). Dinamarca experimentó una disminución sustancial de un 60% en la incidencia de sucesos cardiovasculares y cerebrovasculares, debido en parte a una ingesta progresivamente menor de grasa *trans* procedente de margarinas (Stender & Dyerberg, 2004).

La “Asociación Internacional de Margarinas de los Países Europeos” se propuso como objetivo, hace unos 20 años, considerar un máximo permisible de 1,25 %TFA en la fase grasa de una margarina tradicional, y no superar 5 %TFA, sobre grasa total, en margarinas industriales. Las grandes corporaciones de la industria alimentaria (Unilever, Kraft-Foods, Nestlé) adoptaron medidas innovadoras para reducir la grasa *trans*, en sus productos y Unilever decidió eliminar prácticamente los ácidos grasos *trans* en las margarinas europeas (Korver & Katan, 2006; Eckel *et al.*, 2007).

3.4.2 Niveles de grasa trans en margarinas

En la Tabla 8 se ofrecen los contenidos de grasa *trans* en las margarinas de algunos países representativos. Desde 1965 las margarinas de Canadá presentaban niveles promedios (20-25 %TFA, sobre grasa total), con rangos preocupantes de 12 – 65 %TFA. Si consumían margarinas duras (algunas con menos del 5% de ácido linoleico) fabricadas a partir de aceites vegetales parcialmente hidrogenados (PHVO) se exponían a ingerir hasta 1,5 % de *trans*-18:1 (ácido elaídico, principalmente) (Ratnayake *et al.*, 2007). Con las primeras reformulaciones de margarinas en Canadá (entre 2005 y 2007) se reformuló el 72% de las margarinas reduciendo los contenidos estimados de 26 ± 13 %TFA, sobre grasa total, a niveles de 2-4 %TFA y, en algunas blandas, al 0,8 %TFA sobre grasa total (Ratnayake *et al.*, 2009). En EE. UU., al igual

que en Canadá, los contenidos de grasa *trans* en margarinas han sido muy elevados (generalmente dentro del rango 14,9 – 27,7% pero con algunos valores extremos de 40 – 50 %TFA), lo cual no era de extrañar, teniendo en cuenta el uso casi masivo de aceite de soja parcialmente hidrogenado en su fabricación. Aún en 2012, el valor promedio en margarinas era del 11,59 %TFA. Las más sanas [sin uso PHVO, ácidos grasos saturados menores al 20% y ácido linoleico (PUFAs) mayor del 40%] solían ser más caras, y no estaban ampliamente difundidas. En Canadá y EE. UU. se llegaron a encontrar niveles preocupantes de 2,1 – 4,0 %TFA en la leche de madres lactantes (Chen *et al.*, 1995; Doell *et al.*, 2012; Remig *et al.*, 2010).

Si se comparan los contenidos de grasa *trans* en las margarinas de Japón, los datos también eran altos. En el periodo comprendido entre 1995 y 2003 se pasó de aproximadamente un 24 %TFA promedio a un 11 – 12% promedio, casi a la mitad. En Italia, con niveles de grasa *trans* en margarinas similares a los de España en los ochenta (1980s), se pasó a partir de 2004, a una situación con alternativas: aquellas fabricadas con aceites hidrogenados presentaban un promedio muy variable ($7,2 \pm 8,3$ %TFA), mientras que las variedades blandas y reformuladas podrían considerarse “cero-*trans*” ($0,47 \pm 0,33$ %TFA). Como se observa, al igual que sucede con las margarinas ensayadas (Tabla 7) la desviación estándar era alta, y la suma (*trans*-18:2 + *trans*-18:3) duplicaba la de *trans*-18:1. En realidad, estos valores por debajo del 0,5 %TFA se corresponden con los niveles de TFA encontrados en los aceites vegetales refinados, y son consecuencia de las etapas de blanqueamiento y, sobre todo, de desodorización (Caponio & Gomes, 2004; Yamada *et al.*, 2010).

Tabla 8. Contenido de grasa trans (porcentaje sobre grasa total) en margarinas de varios países.

% TFA					
País	Año	Blanda	Dura	En conjunto	Referencia
Canadá	1977			12,0-64,8	Ratnayake <i>et al.</i> , 2007
	1990s	2,2 (sin PHVO)	20-40 (con PHVO)		
	1999	1,1- 44,4	39,8		
	2007	0,8			
EE. UU.	1990s	14,2	24,8		Garsetti <i>et al.</i> , 2016
	2003			17	
	2013			0,1-21,7	
Dinamarca	1990	2,9	6,2		Stender&Dyerberg, 2004
	1996	0 -1,9			
Francia	1996			0,2-0,6	L'Abbé <i>et al.</i> ,2009
	2003	1,0	0,9		

% TFA					
País	Año	Blanda	Dura	En conjunto	Referencia
Italia	1970s			7-35	Caponio & Gomes, 2004
	1990			6,48 ± 9,75	
	2000-2010			7,26 ± 8,35 (con PHVO) 0,47 ± 0,33 (reformulados)	
Finlandia	2012			0-1,10	Helldan <i>et al.</i> , 2013
Serbia	2015	0,17-6,89	16,30-28,84		Vučić <i>et al.</i> , 2015
Eslovenia	2018			0,11-6,37	Abramovič <i>et al.</i> , 2018
Pakistán	2002			22,0-34,8	Bhanger & Anwar, 2004
	2004	Menos de 4,1	1,6-23,1		

Los daneses han sido tradicionalmente grandes consumidores de margarina, de ahí sus preocupaciones legislativas pioneras en torno a las grasas *trans*. En 1996 ya consiguieron, en las margarinas blandas [ácido linoleico superior al 40%, según la clasificación de (Ovesen *et al.*, 1998)] niveles en el tramo 0-1,9 %TFA, sobre grasa total y, en general, el porcentaje de grasa *trans* era inversamente proporcional al contenido de ácido linoleico de la margarina en cuestión:

- Si linoleico era menor de 20% (duras): 0-14,2 %TFA;
- Si linoleico era 20 – 40% (semiblandas): 0 – 5,8 %TFA (Ovesen *et al.*, 1998).

Dinamarca experimentó una reducción significativa del 60% en la incidencia de enfermedades cardiovasculares debido en gran parte a un menor contenido de grasa *trans* de sus margarinas. Con su legislación restrictiva y el apoyo de la industria alimentaria introduciendo sustituyentes de los aceites hidrogenados han posibilitado en la actualidad disponer usualmente de margarina *cero-trans* (Pande & Akoh, 2014; Leth *et al.*, 2006).

En Francia, desde 1996, los contenidos de grasa *trans* en las margarinas “de marca” descendieron considerablemente, pasando de 15 – 20 %TFA a valores por debajo del 1% (0,2 – 0,6%). En 2005, la “Agencia Francesa de Seguridad Sanitaria de los Alimentos (AFSSA)” (equivalente a la AESAN en España) propuso contenidos límites de menos de 1 %TFA, sobre grasa total, en grasas visibles, como la margarina, sin aumentar el porcentaje de grasa saturada (Combe, 2002; Morin, 2005).

En el Reino Unido se produjo un descenso de los niveles de grasa *trans* cifrado en un 70% en las margarinas blandas (2,5 %TFA) (Roe *et al.*, 2013). Polonia alcanzaba en margarinas duras valores cercanos al 60 %TFA, similares a los de Canadá y EE. UU.. Serbia, en 2015, comercializaba margarinas duras hasta con un 30 %TFA, sobre grasa total, y un alto porcentaje de grasa saturada, de modo que sus investigadores clamaban por una pronta regulación administrativa. Este comportamiento es generalizado en los países del Este Europeo (República Checa, Bulgaria...) y sólo recientemente Eslovenia parece aplicar reformulaciones (Silva *et al.*, 2021; Vučić *et al.*, 2015).

En países como India y Pakistán la preocupación es máxima, por la gran influencia en los accidentes cardio- y cerebrovasculares mostrada por el uso popular de aceites y margarinas fabricadas con grasas hidrogenadas, y productos como el vanaspati de uso a nivel doméstico y de venta callejera. En Pakistán se han alcanzado niveles cercanos al 40 %TFA, con la particularidad de niveles de *trans*-18:2 del 1,5%, indicios de grasa animal, niveles de PUFAs inferiores al 20%, y una suma de grasa *trans* más grasa saturada del 70%, cuando se aconseja no sobrepasar el 40% para esta suma (Kandhro *et al.*, 2008).

Argentina y Brasil, en Sudamérica, han implementado medidas legislativas con respecto a las grasas *trans*, a diferencia de otros países sudamericanos como, por ejemplo, México. Los niveles para margarinas argentinas ofrecen una mediana de 1,1%, sobre grasa total, con un rango de 0,5 – 1,9%, que es bastante bajo (Kakisú *et al.*, 2018).

En varios países, como EE. UU., Italia o Polonia, se han encontrado un rango de resultados muy variable. ¿A qué se debe esta variabilidad? Puede deberse a algunos factores, como:

- Condiciones (tiempo-temperatura, presión, tipo y soporte del catalizador, velocidad de agitación en el reactor) del proceso de hidrogenación parcial;
- Cantidad empleada de ácidos grasos insaturados;
- Si se usa PHVO solo, o en mezclas con aceites no hidrogenados;

- La disponibilidad y el precio de las materias primas grasas.

Evidentemente, la existencia de esta variabilidad afecta a la estimación de las ingestas de grasa *trans* en la dieta (Innis *et al.*, 1999).

3.4.3 Evaluación de la grasa trans en las margarinas españolas

En España, la evolución de los contenidos de grasa *trans* en las margarinas se recoge en la Tabla 9. A finales de los ochenta (1980s) abundaban en España margarinas duras, con menos de 40% de PUFAs, fabricadas con aceites de girasol o de maíz hidrogenados (que se mencionaban en el Código Alimentario Español) y que, aunque con valores promedios de 8,4 %TFA se iban a valores próximos al 16 %TFA en el caso de las más hidrogenadas (Fernández San Juan, 1991). Esta situación continuaba en el 2000, con valores promedio de 8,18 %TFA, aunque aquí ya aparecía una variabilidad estimada en el rango de 0,15 – 20,21 %TFA, siendo las elaboradas con aceite de maíz parcialmente hidrogenado las de mayor contenido en TFA (Alonso *et al.*, 2000). En 2003, seguían estando comercializadas margarinas con cerca de 20 %TFA, fundamentalmente de aceite de maíz hidrogenado, pero ya se disponía de marcas de margarinas blandas (las de mayor consumo) con una elevada composición porcentual de PUFAs, o también semi-blandas, con niveles inferiores al 1% (0,4 – 0,6 %TFA, sobre grasa total) (Larqué *et al.*, 2003). Las reformulaciones en nuestro país no se generalizaron hasta hace no mucho tiempo, pues todavía en 2008 los valores promedios eran 2,8 %TFA (Fernández San Juan, 2009). Los resultados que se obtienen en este trabajo de Tesis (Tabla 7) guardan perfecta concordancia con los obtenidos por autores españoles en margarinas más recientemente, y son inferiores al 1 %TFA, sobre grasa total (Bretón, 2014; Burdaspal *et al.*, 2010; Moreno Alcaide *et al.*, 2014; Pérez-Farinos *et al.*, 2016).

Tabla 9. Contenido de grasa trans en margarinas en España.

Año	% TFA, sobre grasa total	Referencia
1988	15,80	Fernández San Juan, 1991
1993	10,80	Boatella <i>et al.</i> , 1993
1996	16,80	Fernández San Juan, 1996
2000	8,87	Alonso <i>et al.</i> , 2000
2003	2,50	Larqué <i>et al.</i> , 2003
2009	2,80	Fernández San Juan, 2009
2010	0,70	Burdaspal <i>et al.</i> 2010
2016	0,30	Galvin <i>et al.</i> , 2016

3.4.4. Ingestas de grasa trans por consumo de margarinas

La ingesta de niveles elevados de grasa saturada (SFA) y grasa *trans* (TFA) contribuyen a la aparición del síndrome metabólico y diversas enfermedades cardiovasculares (Te Morenga & Montez, 2017). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2019) el consumo de grasa saturada debe ser inferior al 10% del consumo total de energía en la dieta (10 E%) y el de grasa *trans*, inferior al 1% sobre base energética (1 E%).

Adicionalmente, se recomienda la ingesta de ácidos grasos omega-6 y omega-3, en la ratio adecuada; hay que tener en cuenta que el ácido linoleico contrarresta los efectos nocivos de los ácidos grasos *trans* a partir de una concentración en el producto alimentario del 5%, sobre grasa total (Zhang *et al.*, 2021).

En los años noventa (1990s) un tercio de la ingesta total de grasa *trans* procedía del consumo de margarina (Ascherio *et al.*, 1999). En los países escandinavos los expertos recomendaron la ingesta de 2/3 de blandas y 1/3 de duras, en el consumo de margarinas (Aro, 2006). En Brasil donde el consumo de margarina, con destacable proporción de grasa *trans* (uso de aceites hidrogenados), implicaba el 35% del consumo total de ácidos grasos *trans* en la dieta, cuando reformuló en 2005 (sustituyó el aceite hidrogenado con aceites de palma y palmiste),

se pasó de una ingesta, sobre base energética, de 2,4 %TFA a otra de 1,4 E% TFA, prácticamente la mitad (de Castro *et al.*, 2009).

En los años ochenta (1980s), el consumo promedio de margarina en España era de 3,8 g/p/d. En esas fechas, el consumo de este alimento era de 16 g/p/d en EE. UU., y de 47,9 g/p/d en Dinamarca. En países como Canadá, EE. UU. y Dinamarca, el consumo a nivel doméstico de margarina se llegó a considerar como uno de los principales determinantes de los niveles plasmáticos de TFA (Skeaff & Gowans, 2006). El consumo de margarina en España descendió en más de un 50% entre 1987 y 2003 (Larqué *et al.*, 2003). Este descenso coincidió en el tiempo con la controversia del empleo de aceites hidrogenados en la fabricación de las margarinas, fuente de grasa *trans* que podía ocasionar trastornos en el sistema cardiovascular. En 1998 se consumió en España 1,6 g/p/d de margarina, había descendido el consumo, pero aun así era tres veces superior el consumo de mantequilla (Alonso *et al.*, 2000); teniendo en cuenta los niveles de grasa *trans* de las margarinas españolas entonces, supondrían un aporte de 0,22 g TFA/p/d procedente de margarinas, el 10,5% de la ingesta total de TFA por persona [teniendo en cuenta una ingesta de 2,1 g/p/d de grasa *trans* en España deducida del estudio TRANSFAIR (Hulshof *et al.*, 1999)]. Entre 2000 y 2005, la cifra de ingesta de margarina se estabilizó en 0,3 g/p/d, con mayor consumo en Navarra y País Vasco, y una preponderancia en el estatus socioeconómico medio-alto [Varela Moreiras, G (Coord), 2006]. Hay que hacer notar que si la contribución de la margarina a la ingesta total de grasa *trans* representó el 25% en EE. UU. (2003-2006), sólo representaba el 2-3% en España (2001-2010) (Remig *et al.*, 2010). Actualmente, la ingesta promedio de margarina en España es de 0,55 g/p/d (MAPAMA, 2022). Suponiendo un contenido medio de 0,5 %TFA, sobre grasa total, en las margarinas españolas, y considerando un 80% de grasa total, la contribución de la margarina a la ingesta de grasa *trans* sería muy baja, de 0,002 g TFA/p/d. El consumo es más abundante en Andalucía, pero no pasa de 0,86 g/p/d, y es más activo entre las clases media-baja.

3.4.5 Alternativas tecnológicas al uso de aceites parcialmente hidrogenados en la fabricación de margarinas

La “Food & Drug Administration (FDA)” americana tomó la decisión en el 2013 de no considerar ya más como sustancia GRAS (“generally recognized as safe”) a los aceites

parcialmente hidrogenados (PHVOs) y estableció una fecha límite de 3 años para eliminar por completo la grasa *trans* en los alimentos (FDA, 2013).

Como alternativas posibles para procurar margarinas “cero-*trans*”, o con muy bajos niveles de grasa *trans*, se eligió primero el aceite de palma, y sus fracciones (oleína y estearina de palma) que se podían obtener industrialmente por fraccionamiento. Su natural consistencia semisólida puede endurecerse posteriormente mediante interesterificación aleatoria (Ozay *et al.*, 1998) o por fraccionamiento, otorgándole una estructura cristalina con morfología β' deseable, que proporciona una gran área superficial en los cristales y plasticidad considerable. Se logran así margarinas con contenidos inferiores al 1 %TFA, sobre grasa total. Dada la notable diferencia en las extinciones de las bandas IR correspondientes a los ácidos eláidico y palmítico, y teniendo en cuenta que el ácido palmítico representa sólo el 44% del aceite de palma, se puede deducir la mínima interferencia del ácido palmítico en la determinación de TFA por ATR-FTIR (-2D) (Aini & Miskandar, 2007) que oscila entre 0,2 y 0,5%, sobre la grasa total en la margarina, considerando el porcentaje habitual de aceite de palma. Hay que destacar la interesterificación enzimática, que consigue margarinas “cero-*trans*”, con buen sabor y coste eficiente (Cowan & Holm, 2006; Kadhum & Shamma, 2017).

Las más novedosas alternativas, y las expectativas de futuro para lograr margarinas más sanas consisten en reemplazar las grasas con organogeles (aceites vegetales estructurados). Se trata de sistemas con fase orgánica líquida no polar y agentes estructurantes con bajas concentraciones. Pueden aplicarse al desarrollo de emulsiones estructuradas, como margarinas “cero-*trans*”, bajas en grasa saturada y ricas en ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) (Hwang, 2020). Como agentes estructurantes se han utilizado partículas cristalinas y filamentos poliméricos (etilcelulosa, esteroides vegetales y ceras, entre otros); pero en margarinas se han empleado, sobre todo, ceras vegetales. Los agentes estructurantes para uso alimentario deben ser reconocidos como sustancias GRAS por la FDA, y ser capaces de lograr la estructuración a concentraciones bajas (Chaves *et al.*, 2018).

Cualquier reformulación que se lleve a cabo para fabricar nuevas margarinas con bajos valores de grasa *trans*, deben procurar un producto con las adecuadas características funcionales, esto es:

- Untuosidad;
- Suavidad;

- De textura firme;
- Estable;
- Sanitariamente seguro.

Los principales desafíos que implican las reformulaciones de las margarinas pueden categorizarse en:

- (1) La mejora de los parámetros involucrados en la interesterificación química y enzimática;
- (2) La posibilidad de uso de lípidos estructurales o nuevas bases lipídicas (ceras, poliésteres de sacarosa) que puedan interesterificarse;
- (3) El uso de mezclas y de organogeles.

El objetivo es producir margarinas “cero-trans”, con poca grasa saturada y propiedades funcionales y sensoriales optimizadas (Silva *et al.*, 2021).

3.5 Conclusiones

Desde el punto de vista práctico y legislativo interesa cuantificar globalmente la totalidad de los enlaces *trans* aislados (no conjugados), independientemente de que procedan de un ácido monoenoico (*trans*-18:1) o de un ácido polienuico (*trans*-18:2, *trans*-18:3), con tal de que sean aislados. En este sentido, la aplicación de la espectroscopía de absorción infrarroja, a través, del método oficial AOCS de segunda derivada 2009 ATR-FTIR O.M Cd 14e-09 (Mossoba *et al.*, 2011) y utilizado por primera vez en el análisis de aceites vegetales comestibles y margarinas en 2004 (Milosevic *et al.*, 2004) es mucho más sencillo, rápido, eficiente y económico que la técnica de cromatografía de gases, tanto a nivel de control legislativo (seguridad alimentaria) como en el control de procesos. Este es el método que aplicamos en esta Memoria para el control de margarinas españolas reformuladas.

Dentro de la espectroscopía IR se han ido produciendo sucesivos avances desde las iniciales medidas dispersivas. Primero fue la aplicación de las transformadas de Fourier, y después, la incorporación de la “reflexión total atenuada” (ATR). Esto permitió que:

- Aumentase la profundidad de penetración de la radiación IR, que se refiere al campo eléctrico componente de la radiación IR, penetrando una distancia micrométrica (menos de 5 μm) en la fase oleosa ensayada;
- Al ser pequeña la capacidad del cristal ATR, es posible realizar la medida para tamaños de muestra muy pequeños (1-10 μL). Esta circunstancia resulta muy ventajosa si se compara con el tiempo que se consumía en la preparación de disoluciones de muestras (normalmente, al 10%) en disolventes que, además, eran volátiles y tóxicos (CCl_4 , CS_2) (Chalmers & Griffiths, 2001).

En el 2000 se validaron los métodos oficiales ATR-FTIR para la determinación de las grasas *trans*, tanto por la AOCS como por la AOAC (Adam *et al.*, 2000; Mossoba *et al.*, 2001). Finalmente, en 2011 se validó el método de la segunda derivada, ATR-FTIR (-2D) (Mossoba *et al.*, 2011), que presenta indudables ventajas, como son:

- No hay inclinación de la línea-base correspondiente a la banda *trans* a 966 cm^{-1} , la línea base es totalmente horizontal; esto ya se daba en los métodos oficiales del 2000 (Mossoba *et al.*, 2007);
- Se reduce el nivel de ruido espectral;
- Al estrecharse el ancho de la banda, se aumentan la exactitud y la selectividad, sobre todo para estos niveles de TFA inferiores al 1 %TFA, sobre grasa total; las bandas vecinas asignables a la grasa saturada y a los ácidos linoleicos conjugados, que eran poco visibles en el método anterior (AOAC, 2000.10), ya se pueden distinguir perfectamente y resolver en el método actual de la segunda derivada;
- No se necesita obtener previamente los ésteres metílicos de los ácidos grasos (FAMES), más laborioso, como sí se recomendaba, para niveles inferiores a 15 %TFA, en el método ATR-FTIR AOAC 2000.10, para evitar la banda interferente a 935 cm^{-1} , atribuible a la vibración de deformación fuera del plano del -OH del grupo funcional -COOH (Mossoba *et al.*, 1998);
- El fondo de referencia espectral es aire, no se necesita ningún aceite estándar nativo *cero-trans*, de composición lo más próxima posible a la muestra que se mide;
- Se tarda muy poco tiempo, apenas unos 5 minutos;

Capítulo 3

Determinación de grasa trans por el método espectroscópico ATR-FTIR (-2D) de segunda derivada en margarina reformulada

En la actualidad, cuando tecnológicamente se puede prescindir del uso de aceites parcialmente hidrogenados para su fabricación, según lo establecido por la “Food & Drug Administration” (FDA, 2013), la margarina, que ha mejorado y equilibrado su composición grasa, vuelve a relanzarse como una alternativa no colesterolémica a la mantequilla. Además, amplía sus aplicaciones en repostería y pastelería (Albers *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2021).

CAPÍTULO 4.1:

Determinación de grasa *trans* en productos
alimentarios escogidos

Capítulo 4.1: Determinación de grasa trans en productos alimentarios escogidos

4.1.1 Introducción

El conocimiento de la grasa *trans* se nutre de los datos que se consigan experimentalmente sobre su contenido en los productos alimentarios que consumimos en nuestra dieta diaria y las ingestas poblacionales en distintas edades, distintos países y distintas franjas sociales. La determinación de los contenidos de grasa *trans* en distintos tipos de alimentos ayuda a ampliar las bases de datos, y actualizar las Tablas de Composición de Alimentos que, por otro lado, están en la base del cálculo de las ingestas poblacionales de grasa *trans*. Además, se suministra información de primera mano a las agencias alimentarias oficiales (FDA, EFSA, AECOSAN, y otras).

Las iniciativas gubernamentales que tenían como foco a la industria alimentaria para que usaran como alternativa a los aceites parcialmente hidrogenados (PHVOs), grasas *cis*-insaturadas, no pasaban del nivel de las recomendaciones. La elección de los sustitutos de los PHVOs se dejó entonces a lo que manifestaban las fuerzas del mercado. Y la decisión, en su momento, fue emplear como reemplazantes los aceites tropicales (de palma, palmiste y coco), sobre todo, el uso del aceite de palma o sus derivados, como la estearina de palma. Este producto presentaba fácil abastecimiento, precios bajos, cierta estabilidad y características físicas y sensoriales favorables. Además, es semisólido a temperatura ambiente pero presenta una carga de 44% de ácido palmítico, ácido saturado, lo que constituía un inconveniente (Skeaff, 2009). Se creó entonces una polémica, en torno al uso del ácido palmítico. De hecho, hace pocos años (Marangoni et al., 2017) un grupo de expertos reunidos en un Simposio sobre este tema organizado, por la Fundación de Nutrición de Italia, concluían que no parecían existir evidencias de los efectos sobre la salud pública del aceite de palma, en comparación con otras grasas ricas en ácidos grasos saturados. Más allá de la polémica, en los últimos años se ha mejorado los productos procesados rebajando los componentes lipídicos (ácidos grasos *trans* y saturados) mediante el empleo de organogeles, hidrogeles monoglicéricos o mediante el empleo de grasas interesterificadas (Chaves *et al.*, 2018).

Cuando se pretenden emplear nuevas alternativas al uso de los aceites hidrogenados habría que tener en cuenta:

- Disponibilidad;
- Logística de las cadenas de suministro;
- Costes;
- Aceptación del consumidor (Borra *et al.*, 2007).

La espectrofotometría de infrarrojo de segunda derivada, la técnica ATR-FTIR (-2D), que se emplea en esta Tesis presenta indudables ventajas y mejoras respecto a las técnicas infrarrojas anteriormente propuestas. Así:

- Presenta una alta tasa de operaciones de medida, siendo ideal para análisis rutinario;
- Debido a una mayor estrechez de la banda de 963-966 cm^{-1} , el método gana en selectividad y resuelve las posibles interferencias de ácidos grasos saturados (SFA) y ácidos linoleicos conjugados (CLA);
- Se evidencia una fuerte mejora de los componentes de baja frecuencia (bajo número de onda) en la descomposición de Fourier del espectro de absorción FTIR;
- Buena resolución: la banda de la grasa *trans* a 966 cm^{-1} es puntiaguda y simétrica, mientras que la banda de la grasa saturada (SFA), alrededor de 960 cm^{-1} , es más plana y asimétrica;
- No se requiere la derivatización de los ácidos grasos hasta sus ésteres metílicos (FAMES) y la referencia espectral es el aire. Por lo tanto, no hay que utilizar una grasa estándar especialmente refinada exenta de grasa *trans* (Mossoba *et al.*, 2007, 2011).

En la primera parte de este Capítulo 4 se plantean como objetivos:

- Determinar los niveles de grasas *trans* en productos alimentarios procesados que no lo declaran en el etiquetado nutricional;
- Determinar de forma concreta los niveles de grasa *trans* en productos etiquetados como “cero-*trans*”;
- Determinar la posible presencia de grasa *trans* en productos procesados sospechosos de contenerla;
- Determinar posibles contenidos de grasa *trans* en productos alimentarios sin etiquetado nutricional, o productos de establecimientos de “comida-rápida” (“fast-foods”).

Para ello se ha realizado una pequeña, pero representativa, selección de productos alimentarios entre los que más pueden predominar los ácidos grasos *trans* (TFAs), de acuerdo con experiencias previas en España y en países de nuestro entorno.

4.1.2. Material y Métodos

4.1.2.1 Reactivos y Aparatos

4.1.2.1.1 Reactivos

- Trielaidina (TE) [1,2,3-tris(*trans*-9-octadecenoato) de glicerilo]. Se conserva en congelador (-20 °C) hasta el momento de su uso. Cuando se vaya a usar hay que descongelar la muestra durante una noche. Banda de absorción destacada a 966 cm⁻¹ en el espectro ATR-FTIR (-2D) del producto (pureza > 99%, Sigma-Aldrich).
- Tripalmitina (TP) [1,2,3-tris(hexanodecanoato) de glicerilo]. Se conserva en congelador (-20 °C) hasta el momento de su uso. Cuando se vaya a usar hay que descongelar la muestra durante una noche. Banda de absorción destacada a 956 cm⁻¹ en el espectro ATR-FTIR (-2D) del producto (pureza > 99%, Sigma-Aldrich).
- Etanol absoluto, ácido clorhídrico concentrado (12 M), pirogalol, éter etílico, éter de petróleo, sulfato sódico anhidro, *n*-hexano. Todos estos reactivos eran de calidad analítica (R.A), y 99.9% de pureza, de Merck, o marcas comerciales similares.

4.1.2.1.2 Aparatos

- Espectrofotómetro de infrarrojo Jasco FTIR-4200 A, con software QAU-400 Quantitative Analysis Program (Jasco Analytica, Japón).
- Balanza analítica Mettler AE 100.
- Triturador-homogeneizador Waring-Blendor, con cuchillas de acero inoxidable.
- Rotavapor R-300 Buchi.
- Agitador Vortex Ika. Genius 3, mod. VG3
- Baño de agua termostatzado Selecta, con agitador intermitente.
- Embudo Büchner para filtración, acoplado a bomba de vacío.
- Embudo de decantación para extracción, de 250 mL.
- Viales de vidrio Pyrex de 10 mL y 20 mL, con tapones de rosca.
- Micropipeta de 1-10 µL.

4.1.2.2 Muestras

Basándose en los principales ingredientes y características de los artículos alimentarios, así como en la distribución empleada en otros estudios similares recientes (Albuquerque et al., 2018), se optó por el agrupamiento propuesto por la FAO para los productos alimentarios que se eligieron (en función de la posible preponderancia de grasa *trans*) que se expone a continuación (FAO / INFOODS, 2012).

Categoría de alimento	Producto seleccionado
Horneado/bollería	Donete, <i>dónuts</i>
Galletas, bizcochos, obleas	Galleta “cookie”
<i>Snacks</i>	Gusanitos, palomitas
Comidas listas para consumir	Sopa deshidratada
“Comida rápida”	Patatas fritas, hamburguesas

Los productos alimentarios se adquirieron en supermercados, hipermercados o establecimientos locales y se analizaron lo más pronto posible, antes de su fecha de caducidad. Se ha omitido ensayar bollería convencional (cruasán, suizos, palmeras,...) porque en anteriores estudios en nuestro país no se demostró contenidos de grasa *trans* (Ansorena et al., 2013; Pérez-Farinós et al., 2015).

4.1.2.3 Calibración del método

Se prepararon mezclas estándares de trielaidina (TE) y tripalmitina (TP) pesando hasta la cuarta cifra decimal, con balanza de precisión, en viales de vidrio Pyrex de 10 mL. Los viales, después de homogenizar y tapados, se llevaron a un baño de agua termostaticado a 70 °C, con agitación intermitente, hasta fusión de los reactivos mezclados.

Se retiran los viales del baño, y se agita con Vortex para homogenizar, antes de la medida en el espectrofotómetro infrarrojo. Se obtuvieron los siguientes valores (Tabla 10).

Tabla 10. Calibración del método aplicado.

Punto	% TE ^a	AU/cm ² ·10 ³
1	0,13	0,11
2	15,02	0,30
3	20,18	0,38
4	40,61	0,74
5	100	2,14

^a Porcentaje de TE en la mezcla TE-TP, representa el % TFA, sobre grasa total.

Representando dichos puntos se obtiene la recta de calibrado. La ecuación de regresión es:

$$y=2 \cdot 10^{-5}x + 2 \cdot 10^{-6}, \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde:

$x = \% \text{ TFA}$;

$y = m\text{AU}/\text{cm}^{-2}$;

$R^2 = 0,9900$, muy elevado, lo que confirma la existencia de una alta dependencia lineal entre los valores de $m\text{AU}/\text{cm}^{-2}$ y el % TFA.

A partir de la ecuación de regresión se puede obtener el porcentaje de TFA (% sobre grasa total) de cualquier grasa que se ensaya, despejando $x = (y - 2 \cdot 10^{-6}) / 2 \cdot 10^{-5}$.

Se calculó la ratio señal-ruido (SNR):

$$SNR = \frac{B}{A}$$

Donde:

$B = \text{altura de banda (mAU}/\text{cm}^{-2})$ que corresponde al valor más bajo de TE en la mezcla de estándares TE-TP de la recta de calibrado;

$A = \text{nivel de ruido pico a pico, suministrado en los espectros IR de las mezclas de estándares TE+TP de la recta de calibrado.}$

En este caso, $SNR=0,11/0,01= 11:1$. Como este valor supera a 10:1, puede emplearse con seguridad el detector DTGS, y pueden detectarse niveles de grasa *trans* inferiores al 1%, sobre grasa total (Mossoba *et al.*, 2011).

4.1.2.4 Tratamiento de las muestras

Hasta su tratamiento las muestras se pueden guardar en frigorífico en bolsas LDPE (polietileno de baja densidad) para uso alimentario. Se utiliza como procedimiento estándar el Método AOAC 996.06 (AOAC, 2006): se lleva a cabo una hidrólisis con ácido mineral medianamente concentrado, previa a la extracción de la grasa con mezcla 1:1 v/v de éter etílico-éter de petróleo.

Los otros procedimientos que se han empleado para el tratamiento de las muestras (método de Folch, método de Soxhlet) no correlacionaron bien con este tratamiento propuesto por la AOAC. Ninguno de estos dos métodos lleva a cabo una hidrólisis eficiente. El método de Folch es una extracción en frío con cloroformo en un ácido débil (ácido acético). El método de Soxhlet es una extracción, generalmente con éter de petróleo, a alta temperatura. En realidad, por los métodos de Folch y de Soxhlet sólo se tendría en cuenta la grasa bruta, mientras que para referirnos a la “grasa total” del alimento es necesario aplicar el método de hidrólisis clorhídrica de la AOAC, que aquí se propone (Hyvönen, 1996).

Como el alimento es una matriz compleja que incluye proteínas, carbohidratos, triacilgliceroles, ácidos grasos libres, glicolípidos, fosfolípidos, esfingolípidos, ésteres de colesterol y materia insaponificable (pigmentos, vitaminas...), se requiere una acción hidrolítica intensa (HCl, 8,3N) para conseguir un extracto lipídico completo y cuantitativo desde la matriz del alimento. Este extracto lipídico necesita estar libre de agua y de cualquier impureza sólida, para evitar la reflexión difusa de la señal de infrarrojo (Mossoba *et al.*, 2009a). Como se emplea un ácido mineral en caliente, se hace necesario añadir pirogalol que actúa como antioxidante y evita que se oxiden los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs).

Procedimiento

Se tritura la muestra del producto alimentario, después de trocearlo, en una trituradora-homogeneizadora Waring-Blendor, durante 1-3 minutos, a 5.000 ciclos por minuto. Se pesan, exactamente, 2 g de la muestra triturada en un vaso de precipitados de

vidrio pequeño. Con ayuda de 2 mL de etanol absoluto se agita la muestra durante 1 minuto y luego se trasvasa a un tubo de vidrio Pyrex de 150 x 20 mm. A continuación, se adiciona un poco de etanol absoluto resbalando por las paredes interiores del tubo Pyrex y procurando que se empapen bien las partículas del alimento. Se añaden 10 mL de HCl 8,3N y 100 mg de pirogalol, introduciendo a continuación el tubo en un baño de agua termostaticado a 80 °C, con agitación de 80 ciclos por minuto, durante 40 minutos. Se retira a continuación el tubo del baño y se deja enfriar hasta temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C). Se añaden 10 mL de etanol absoluto, se homogeniza con ayuda de un Vortex, y se trasvasa a embudo de decantación de 250 mL. Se añaden 12,5 mL de éter etílico y 12,5 mL de éter de petróleo, y se agita durante 5 minutos. Las fases acuosa y oleosa se dejan decantar hasta que la capa etérea superior no presenta turbidez. Se separa la capa etérea superior, que se hace pasar a través de papel Whatman No. 42, recubierto de sulfato sódico anhidro, acoplado a embudo Büchner. El filtrado se lleva a un rotavapor, donde se elimina a presión reducida y a 40 °C el disolvente etéreo. Las últimas trazas de disolvente se eliminan bajo corriente de N₂. La fase oleosa obtenida se guarda en viales de vidrio de 10 mL provistos con tapón de rosca a bajas temperaturas (5 °C) hasta su análisis en el espectrofotómetro de infrarrojos tan pronto como sea posible.

4.1.2.5 Procedimiento espectrofotométrico ATR-FTIR (-2D) de segunda derivada (AOCS, 2009)

La fase oleosa se deposita y extiende sobre el cristal ATR de ZnSe, cubriéndolo completamente, procurando que no se formen gotitas. La temperatura debe estar dentro del rango 20-40 °C, ya que el cristal ATR es sensible al frío y al calor, y podría explotar (Mossoba *et al.*, 2009b). Si la muestra solidifica parcialmente, se pulveriza en mortero de ágata, pero la exactitud no se resiente, pues un aumento de la altura de banda se compensa cuantitativamente con un estrechamiento del ancho de la misma.

La radiación infrarroja, procedente de la fuente, se interna en la fase oleosa, después de atravesar el cristal ATR. Al pasar, desde un medio de alto índice de refracción (cristal ZnSe) a otro de índice de refracción más bajo (fase oleosa), en lugar de transmitirse experimenta una reflexión interna, siempre que el ángulo de incidencia sea mayor que el ángulo crítico. Se produce una onda evanescente conforme se aleja del cristal, cuya intensidad descende por el paso de luz y la absorción de radiación por la muestra, de ahí

el nombre de “reflexión total atenuada (ATR)”. El paso de luz es inherentemente preciso y muy pequeño, con lo que se pueden ensayar tamaños de muestra muy bajos (1-10 μL). La luz internamente reflejada produce un interferograma (datos infrarrojos sin refinar) que luego se transforma matemáticamente (transformadas de Fourier) en espectros de rayo único y se pueden medir tomando como referencia espectral el aire.

Para cada muestra se co-adicionan 64 exploraciones, que son suficientes para, por una parte, mejorar la ratio señal-ruido (SNR), y por otra, posibilitar detectar niveles de grasa *trans* inferiores al 1-2%, sobre grasa total. Los espectros ATR-FTIR se acumulan en el rango de número de onda 4.000-600 cm^{-1} , con una resolución espectral de 4 cm^{-1} .

Para el procedimiento de segunda derivada (AOCS Official Method Cd 14e-09) (AOCS, 2009), se usó una extensión espectral, con un rango 1070-830 cm^{-1} . La precisión del método es 0,5 %TFA, sobre grasa total (Mossoba *et al.*, 2011). Se ha propuesto un método de 9 reflexiones internas, que puede alcanzar una precisión del 0,1 %TFA, sobre grasa total (Mossoba *et al.*, 2012). Entre medida y medida, el cristal ATR se limpia suavemente con papel tisú sin hebras, y luego con *n*-hexano, secándolo posteriormente. Las condiciones experimentales son las mismas cuando se procede a la calibración del método, que cuando se procede a la medida de las muestras.

4.1.3 Resultados

En las Tablas 11 y 12 se resumen los resultados obtenidos. Como se puede observar (Tabla 11) los valores de grasa *trans* son muy bajos, inferiores al 1 %TFA, sobre grasa total, excepto para las palomitas de maíz y las patatas fritas de McDonald’s, que están entre el 1% y el 2% TFA, sobre grasa total. En cualquier caso, ninguno de los productos ensayados supera el 2% TFA, sobre grasa total, límite que marca la actual legislación Comunitaria y española, vigente desde el 2021. Se ofrecen también los valores (Tabla 11) para gramos de TFA por ración (o porción) y gramos de TFA por 100 gramos de producto alimentario. Se pueden considerar “cero-*trans*”, de acuerdo con la legislación americana (FDA, menos de 0.5 g de TFA por ración) y la legislación canadiense (“Health Canada”, menos de 0,2 g de TFA por ración). Todos los productos contienen $\leq 0,2$ g TFA por 100 g de peso, excepto las palomitas de maíz, que contienen 0,3 g TFA por 100 g de peso.

Los datos de porcentaje (% p/p) de grasa del alimento, así como su porcentaje (%) de grasa saturada, y el peso de las raciones están recogidos de su declaración nutricional, bien en el etiquetado, bien en la página WEB de la empresa.

Los *dónuts*, sobre todo los recubiertos con capa de chocolate (donetes) presentan signos de aterogenicidad (índice de aterogenicidad > 1). En los demás casos, no existen estos signos (índice de aterogenicidad ≤1) (Tabla 12). Este índice fue propuesto en 1991 por Ulbrich & Southgate (Vučić *et al.*, 2015).

4.1.4 Discusión

De acuerdo con los resultados obtenidos (Tablas 11 y 12) los productos alimentarios ensayados cumplen con lo estipulado en la última Reglamentación de la Comisión Europea (2019) sobre los niveles permitidos de grasa *trans* en los alimentos (que entró en vigor el 2 de abril de 2021) y que establece la limitación al 2% TFA, sobre grasa total, en el contenido de grasa *trans* de origen industrial en los productos alimentarios. Galletas, productos de bollería/confitería (*dónuts*), y *snacks* (gusanitos) ofrecían niveles inferiores al 1% TFA, sobre grasa total. Las sopas deshidratadas, que solían presentar niveles altos de TFAs, ahora son inferiores al 0.5 %TFA, sobre grasa total. Patatas fritas y hamburguesas de establecimientos conocidos de comida rápida (“fast foods”) presentaban contenidos inferiores al 1 %TFA, sobre grasa total, salvo en una de las franquicias, donde se encontraron niveles de 1-2 %TFA en las patatas fritas, no superando, de cualquier modo, el 2 %TFA, sobre grasa total, límite legislativo.

Tabla 11. Contenido de grasa trans de los productos alimentarios ensayados.

<u>Producto alimentario</u>	<u>% Grasa p/p</u>	<u>%TFA^a</u>	<u>g TFA por ración</u>	<u>g TFA por 100 g^b</u>
Donete (A)	28	0,37	0,023	0,104
Dónuts comerciales (B)	27	0,75	0,101	0,202
Dónuts pastelería (C)	---	0,65	---	---
Galletas “cookie” (D)	24	0,51	0,017	0,122
Gusanitos (E)	20	0,25	0,015	0,051
Palomitas Hipermercado (F)	28	1,11	0,093	0,311
Palomitas sin envasar (G)	---	1,44	---	---
Sopa deshidratada (H)	2	0,28	---	---
Patatas McDonald’s (I)	14	1,36	0,152	0,1904
Patatas KFC (J)	13,7	0,42	0,053	0,057
Hamburguesas McDonald’s (K)	8,2	0,20	0,017	0,016
Hamburguesas Burger King (L)	8,6	0,61	---	0,052

^a Sobre grasa total;

^b Por 100 g de producto alimentario.

Tabla 12. Índices de aterogenicidad (IA)^a.

Producto alimentario	% Grasa p/p	% SFA	%TFA ^a	(%SFA + %TFA)	(%MUFA + %PUFA)	IA
Donete (A)	28	17	0,37	17,37	10,63	1,63
Dónuts comerciales (B)	27	15	0,75	15,75	11,25	1,40
Galletas “cookie” (D)	24	12	0,51	12,51	11,49	1,09
Gusanitos (E)	20	2,3	0,25	2,55	17,45	0,15
Palomitas (F)	28	3,1	1,11	4,21	23,79	0,18
Sopa deshidratada (H)	2	0,2	0,28	0,48	1,52	0,32
Patatas McDonald’s (I)	14	1,3	1,36	2,66	11,34	0,23
Patatas KFC (J)	13,7	1,3	0,42	1,72	11,98	0,14
Hamburguesas McDonald’s (K)	8,2	3,2	0,20	3,40	4,80	0,71
Hamburguesas Burger King (L)	8,6	3,1	0,61	3,71	4,89	0,76

^a Índice aterogénico (IA)= (%SFA + %TFA) / (%MUFA + %PUFA).

- Dónuts

Se han ensayado donetes (declara en la etiqueta aceite de palmiste totalmente hidrogenado, grasa de palma y aceite de girasol) y *dónuts* comerciales (declara en la etiqueta aceite de palmiste totalmente hidrogenado, grasa de palma y cubrimiento de cacao). Parece ser que se ha usado como alternativa una interesterificación entre un aceite totalmente hidrogenado y un aceite vegetal.

Los valores obtenidos (Tabla 11) son inferiores al 1 %TFA, sobre grasa total. Parcerisa *et al.* (1999) encontraron valores en el rango 0.6-11.89 %TFA, sobre grasa total en *dónuts*. Ya en el presente siglo se informó de contenidos en el rango 0.15-5.94 %TFA (Vicario *et al.*, 2003) en bollería española, y descendieron a menos del 2 %TFA en 2015 (Pérez-Farinós *et al.*, 2016). Este descenso se mantiene por los resultados hallados en nuestras muestras (Tabla 11) y satisface las exigencias legislativas comunitarias actuales.

Estos resultados contrastan con lo observado en los *dónuts* “Berliner” (22-27 %TFA, sobre grasa total), que alcanzaron los valores más altos de grasa *trans* entre los productos de bollería alemanas (Fritsche *et al.*, 2010), o los contenidos de 10-20 %TFA en los *dónuts* australianos (McCarthy *et al.*, 2008). Los valores hallados en los *dónuts* argentinos fueron variables (0.9-5.6 %TFA) (Kakisu *et al.*, 2018).

- Galleta

Se ensaya una galleta con gotas de chocolate (“cookie”), que declara grasa de palma y manteca de cacao. El valor obtenido ha sido 0,51 %TFA, sobre grasa total, inferior al 1%. En galletas españolas han descendido los contenidos de grasa *trans* notablemente, desde los valores de 0,15-5,94 %TFA de principios de este siglo (Vicario *et al.*, 2003), hasta 0,54 -1,0 %TFA (Ansorena *et al.*, 2013), o el más reciente de 0,62-0,83 %TFA en galletas industriales (Gutiérrez-Luna *et al.*, 2019). Nuestros resultados corroboran esta tendencia (Tabla 13). En el estudio de Gutiérrez-Luna *et al.*, (2019) se ensayaron también galletas artesanales, y el resultado (0,99-3,50 %TFA) no fue el mismo. Los autores aducían falta de estandarización en las fórmulas de elaboración de las galletas, mala práctica de fabricación, o empleo de aceites tropicales.

Tabla 13. Evolución del contenido de grasa trans en las galletas.

País	%TFA ^a	Referencia
España	5,20-9,30%	Vicario <i>et al.</i> , 2003
Portugal	< 1%	Costa <i>et al.</i> , 2016
España	0,5-1,02%	Ansorena <i>et al.</i> , 2013
Brasil	1,2%	Aued-Pimentel & Kus-Yamashita, 2021
España	0,62-0,83%	Gutiérrez-Luna <i>et al.</i> , 2019
España	0,51%	Resultado presente Tesis

^a Sobre grasa total

En Portugal han conseguido rebajar la cifra a 0,20 %TFA, sobre grasa total, para el grupo de galletas, bizcochos y obleas (Albuquerque *et al.*, 2018). En Suecia el porcentaje de TFA en galletas era inferior al 1 % y las ingestas de grasa *trans* en la población son de las más bajas, 0,3 E %TFA, sobre base energética (Trattner *et al.*, 2015). Lógicamente, al utilizar como alternativa al aceite parcialmente hidrogenado grasas de palma, subía el porcentaje relativo de grasa saturada, y, como en nuestro caso (Tabla 12), el producto era ligeramente aterogénico (índice aterogénico un poco superior a la unidad). El descenso por debajo del 1 %TFA está confirmado en Portugal y España (Pérez-Farinós *et al.*, 2016). Lo mismo ha ocurrido en Brasil entre 2003 y 2018, llegándose a niveles de 1,2 %TFA en galletas y bizcochos, aunque con contenidos de grasa saturada muy altos (más del 40%), consecuencia directa del uso de aceites de palma; últimamente se están empleando como alternativa grasas interesterificadas en las galletas (Aued-Pimentel & Kus-Yamashita, 2021).

En Europa y Norteamérica los niveles de TFA en galletas eran variables, aunque superaban en muchos casos el 2-3 %TFA. Así, tenemos los datos de:

- Alemania: 0-3,8 %TFA (Kuhnt *et al.*, 2011);
- Suiza: 0,64-12,26 %TFA (Richter *et al.*, 2009);
- Estados Unido: 8,4 %TFA (Albers *et al.*, 2008), con alrededor de 40% de grasa saturada.

Estos valores están muy alejados de los que se dan en Pakistán (9,3-34,9 %TFA) y en India (hasta 30-40 %TFA). La Agencia de Seguridad Alimentaria y Estándares de la India recomendó la elaboración de galletas y panecillos, de amplio consumo en estos países, descartando el empleo de vanaspati y sugiriendo el empleo de aceites de soja y de lino que, además de no introducir grasa *trans*, aportaban omega-3 y ácido α -linolénico. La situación era tal en la India que la Agencia permitió temporalmente el uso de vanaspati conteniendo hasta un 10 %TFA. La OMS certificó que los fallecimientos en la India por causas cardiovasculares se duplicaron en el período 1985-2015 (Ghafoorunissa, 2008; Tarar *et al.*, 2020).

A partir de 2013 se observa un descenso significativo del contenido de grasa *trans* en galletas de España, Portugal y Brasil (Tabla 13). De tal forma que el contenido en galletas españolas estuvo por debajo del 1 %TFA, sobre grasa total, ya en 2015, con respecto a 2010 (Robledo de Dios *et al.*, 2015) y se ha estabilizado, como demuestran los resultados (Tabla 13). En Portugal el descenso en contenido de *trans* de las galletas fue de un 80 %, y se llegaron a conseguir buenas reformulaciones para evitar, conjuntamente, los contenidos de ácidos grasos *trans* y saturados, aunque esto repercutió en el precio de venta (Santos *et al.*, 2015).

- Gusanitos (*snacks*)

Los gusanitos se declaran como sémola de maíz horneado con aceites de maíz o de girasol. Constituyen un producto-aperitivo y presentan un consumo usual entre la población infantil. En el estudio TRANSFAIR se ofrecían contenidos medios de 0,82 %TFA entre los aperitivos salados (Aro *et al.*, 1998). El contenido en *snacks* americanos era de 1,5 %TFA, sobre grasa total (Albers *et al.*, 2008). Los aperitivos salados en España presentaban un contenido medio de 0,23 %TFA (Robledo de Dios *et al.*, 2015) que aún descendió más entre 2010 y 2015 (Pérez-Farinós *et al.*, 2016) y que se acerca al valor obtenido, 0,28 %TFA, sobre grasa total, en nuestro ensayo de gusanitos. En Portugal se dieron cifras similares para *snacks*, 0,40 %TFA, sobre grasa total (Albuquerque *et al.*, 2018).

- Palomitas de maíz

Se declaran un producto de aperitivo de maíz horneado (sémola de maíz, aceite de girasol). Habría que distinguir entre las palomitas de microondas y las palomitas confeccionadas a partir de la fritura del grano de maíz con aceite de girasol, u otro aceite vegetal refinado. Las primeras, debido a la probable presencia de aceite parcialmente hidrogenado contenían habitualmente elevados niveles de grasa *trans*. Así, McCarthy *et al.* (2008) encontraron niveles que se aproximaban al 30 %TFA, sobre grasa total en palomitas de microondas australianas, mientras que en las ya confeccionadas en bolsas los niveles eran 0,8-1,4 %TFA. En Norteamérica, Albers *et al.*, (2008) encontraron niveles superiores al 30 %TFA, con 37% de grasa saturada. En España se reportaron cifras de 36 %TFA, y de 1-2 %TFA en las ya confeccionadas en bolsas para comercializarlas (Fernández San Juan, 2000). La situación no era diferente en Dinamarca y otros países europeos donde expertos ya advertían que una ración (bolsa) de 30 gramos podría contener hasta 12 gramos de grasa *trans* (Stender *et al.*, 2012). Nuestros resultados en las palomitas de maíz son de 1,44 %TFA, sobre grasa total (palomitas sin envasar, ambigü de cine) y de 1,11 %TFA, bolsa comercializada de hipermercado. Están, pues, en el intervalo 1-2 %TFA, no superan el límite legislativo comunitario del 2 %TFA, y son valores en consonancia con los obtenidos en otros estudios españoles (Pérez-Farinós *et al.*, 2016). Prácticamente, se corresponde con el valor que alcanza el aceite vegetal empleado en la fritura del maíz.

- Sopa deshidratada

En el estudio TRANSFAIR se obtuvieron cifras muy elevadas de grasa *trans* en sopas deshidratadas (7,61-19,13 %TFA) donde, en su fabricación, se solía usar grasa vegetal y grasa animal parcialmente hidrogenada (Aro *et al.*, 1998). Por ese tiempo, se detectaron en cubitos de caldo italianos, fabricados con grasas animales, grasas vegetales de palma y aceite parcialmente hidrogenado, niveles de 10-23 %TFA, sobre grasa total (Strocchi & Marascio, 1992). En España, sucedía lo mismo, alcanzándose cifras variables, pero altas, con un promedio de $15,4 \pm 9,4$ %TFA en sopas de sobre (Fernández San Juan, 2000).

Ya en el presente siglo, los niveles se redujeron. En Alemania, fueron más bajos, aunque variables: $2,02 \pm 5,91$ %TFA (Kuhnt *et al.*, 2011). En la muestra de sopa de sobre

deshidratada que se ensayó se obtuvo un valor de 0,28 %TFA, sobre grasa total, muy bajo, que se sitúa dentro del intervalo 0-1 %TFA que se ha obtenido en sopas deshidratadas españolas más recientemente (Pérez-Farinós *et al.*, 2016). Esto demuestra que han cambiado la fórmula e ingredientes de elaboración de este producto. De hecho, la muestra ensayada declara aceite de oliva como el componente graso empleado en su elaboración. Coincide, asimismo, con el rango 0,3-0,5 %TFA encontrado en sopas deshidratadas argentinas (Kakisu *et al.*, 2018).

- Comida rápida

Se han ensayado muestras de patatas fritas y de hamburguesas de establecimientos de comida rápida (“fast-foods”) de locales distintos. Sólo en un establecimiento (Burger King), y para las hamburguesas, ofrecía la franquicia en su página WEB el contenido de grasa *trans* (0,1 %TFA), cifra que fue inferior a lo que obtuvimos en el procedimiento experimental aplicado.

Las cadenas de comida rápida (McDonald’s, Burger King...) en los 1990s empleaban en Norteamérica y Sudamérica aceites de fritura con alrededor de 23 %TFA, y en países europeos con 10 %TFA (es decir, contenían aceites parcialmente hidrogenados), mientras que en las franquicias de España los niveles eran del 5 %TFA, y en Dinamarca, tan sólo del 1 %TFA (sin duda, obligadas a las exigencias legislativas danesas) (Stender *et al.*, 2006) al inicio del presente siglo (2000-2005).

A la entrada en vigor, en 2006, de la regulación legislativa de la FDA 2003 sobre declaración en las etiquetas, se redujo ostensiblemente el contenido de grasa *trans* (patatas fritas, 2,76 %TFA; hamburguesas, 0,86 %TFA) en las franquicias estadounidenses de comida rápida (Kohn & Mitchell, 2006), con respecto al panorama que se solía encontrar antes del emprendimiento legislativo citado (Satchithanandam *et al.*, 2004). En China, en los considerados “alimentos occidentalizados” (establecimientos de comida rápida) se daban niveles de grasa *trans* dentro del rango 0,66-4,46 %TFA, sobre grasa total (Fu *et al.*, 2010). Y en Japón, en muchos establecimientos de comida rápida se superaba fácilmente el 2 %TFA, sobre grasa total, y se comparaban con los alimentos tradicionales de la cultura japonesa, que contenían menos de 1 %TFA (Yamada *et al.*, 2010).

Es muy interesante considerar la evolución en los Estados Unidos, país, si se piensa, inductor de la comida rápida (“fast-food”). Antes de las medidas legislativas operativas

en este país y programadas por la Agencia “Federal Food & Drug Administration” (FDA), la situación era bastante caótica, pudiéndose alcanzar en patatas fritas de franquicias niveles de hasta 24,7-38,2 %TFA, sobre grasa total (Stender *et al.*, 2006) y llegándose a 24 gramos de grasa *trans* por ración (Mozaffarian *et al.*, 2010). Después de la entrada en vigor en 2006, de la ley reguladora FDA 2003, coincidiendo con concienciación de la sociedad sobre el peligro de la grasa *trans* y la reformulación llevada a cabo por las industrias alimentarias, los niveles descendieron ostensiblemente. Sobre la misma época (2012) se realizaron estudios que incluían indagaciones hasta en más de treinta establecimientos de comida rápida. Los trabajos de Tyburczy *et al.*, (2012) (patatas fritas: 0,51-12,51 %TFA; hamburguesas: 2,79-5,70 %TFA) y de Mossoba *et al.*, (2014) (patatas fritas: 0,65-10,62 %TFA; hamburguesas: 3,39-5,69 %TFA) demuestran que todas las hamburguesas analizadas, y una parte sustancial de las patatas fritas analizadas excedían el límite preceptivo del 2 %TFA, sobre grasa total. Los datos más recientes, aplicando el procedimiento ATR-FTIR (-2D), que es el empleado en la presente Tesis, volvían a ofrecer datos globales de productos de comida rápida (0,47-11,40 %TFA) que estaban un poco por debajo de los anteriores, pero donde seguían apareciendo muestras que superaban el 2 %TFA, sobre grasa total (Karunathilaka *et al.*, 2018).

Las muestras analizadas en esta Tesis, de tres establecimientos de comida rápida, ofrecen valores bajos, inferiores al 1 %TFA, sobre grasa total, excepto en el caso de las patatas fritas de McDonald’s que se sitúan en el intervalo 1-2 %TFA (Tabla 11); en cualquier caso, están por debajo del 2 %TFA, y contrastan grandemente, y positivamente, con la situación de estas mismas franquicias en Estados Unidos. Los valores obtenidos están de acuerdo con el promedio de 1,96 % resultante en alimentos españoles (Robledo de Dios *et al.*, 2015), o con los más recientes de Astiasarán *et al.*, (2017), en el tramo 0,49-0,89 %TFA, sobre grasa total (Tabla 14). Destaca el valor obtenido en hamburguesas, inferior a los valores 2,3-3,3 %TFA, que suministran para este producto en España Burdaspal *et al.*, (2010). Igualmente, se ha confirmado el bajo valor (0,1-0,3) del índice aterogénico en patatas fritas (Tabla 12). También es asumible (alrededor de 0,7) este índice en hamburguesas (Tabla 12).

En la Tabla 14 se puede observar un apreciado descenso a partir de 2008 del contenido de grasa *trans* en patatas fritas de restaurantes de comida rápida, descenso bien patente en España y Portugal. Hay excepciones, como en el caso de Polonia, donde es usual la tendencia a valores muy altos de grasa *trans*, comportamiento bastante común en

los países del Este Europeo. En la Figura 10 se traza la línea del tiempo en España para las patatas fritas de comida rápida. Se contempla un descenso parabólico acusado desde la situación en el estudio TRANSFAIR, a finales de los años noventa (Aro *et al.*, 1998).

Se ha demostrado la importancia de consumir en lugares de restauración de franquicia controlada. Por ejemplo, en Alemania los niveles medio de contenido de grasa *trans* en patatas fritas, hamburguesas, y otros productos de comida rápida (“nuggets” de pollo, pastel de manzana, etc.) fueron de 0,22 %TFA, en franquicias controladas; sin embargo, en establecimientos sin autocontrol, los niveles subieron hasta el 15 %TFA (Kuhnt *et al.*, 2011). Asimismo, en India se produjo una reducción importante para dicho país, alcanzándose niveles de 1,57-3,83 %TFA, sobre grasa total, si el establecimiento de comida rápida empleaba buenas prácticas y evitaba el uso del vanaspati como aceite de cocinar (Khan *et al.*, 2017). En Pakistán se rebajó hasta contenidos de 2,32-6,10 %TFA, en establecimientos con autocontrol, frente a niveles del 15-24 %TFA, que aparecían en establecimientos de comida rápida no franquiciadas e incontroladas (Bhanger & Anwar, 2004).

Tabla 14. Evaluación de los niveles de grasa trans en patatas fritas de establecimientos de comida rápida.

Año ^a	País	%TFA ^b	Referencia
1997	Europa	12-35 %	Aro <i>et al.</i> , 1998
1997	España	33,57%	Aro <i>et al.</i> , 1998
2000	Austria	1,9-18%	Wagner <i>et al.</i> , 2000
2000	España	20,9 ± 12,9%	Fernández San Juan, 2000
2003/2006	España	4-13%	Stender <i>et al.</i> , 2006
2003/2006	Polonia	42%	Zbikowska, 2010
2006	EEUU	2,76%	Kohn & Mitchell, 2006
2008	España	2,50%	Barrado <i>et al.</i> , 2008
2008	Austria	1,72 ± 3,04%	Wagner <i>et al.</i> , 2008
2008	Australia	1,4-3,4%	McCarthy <i>et al.</i> , 2008
2010	Alemania	0,09-0,3%	Fritsche <i>et al.</i> , 2010
2010	España	0,6 -1%	Burdaspal <i>et al.</i> , 2010
2012	EEUU	0,5-12,5%	Tyburczy <i>et al.</i> , 2012
2013	Reino Unido	0,11%	Roe <i>et al.</i> , 2013
2014	Pakistán	0,11-2,4%	Karim <i>et al.</i> , 2014
2014	EEUU	0,65-10,62%	Mossoba <i>et al.</i> , 2014
2015	España	1,96%	Robledo de Dios <i>et al.</i> , 2015
2017	España	0,49-0,89%	Astiasarán <i>et al.</i> , 2017
2017	India	1,57-3,83%	Khan <i>et al.</i> , 2017
2018	EEUU	0,47-11,40%	Karunathilaka <i>et al.</i> , 2018
2018	Portugal	1,63%	Albuquerque <i>et al.</i> , 2018
2021	España	1,36% (McDonald's)	Resultado presente Tesis
2021	España	0,42% (KFC) ^c	Resultado presente Tesis

^a El año hace referencia a la publicación del artículo;

^b Sobre grasa total;

^c KFC: *Kentucky Fried Chicken*.

Tabla 15. Datos para construir la línea del tiempo para patatas fritas de comida rápida en España.

Año ^a	%TFA ^b	Referencia
1997	33,57%	Aro <i>et al.</i> , 1998
2003/2006	4-13%	Stender <i>et al.</i> , 2006
2008	2,5%	Barrado <i>et al.</i> , 2008
2010	1,61%	Burdaspal <i>et al.</i> , 2010
2017	0,49-0,89%	Astiasarán <i>et al.</i> , 2017
2021	0,42-1,36%	Resultado presente Tesis

^a El año hace referencia a la publicación del artículo;

^b Sobre grasa total.

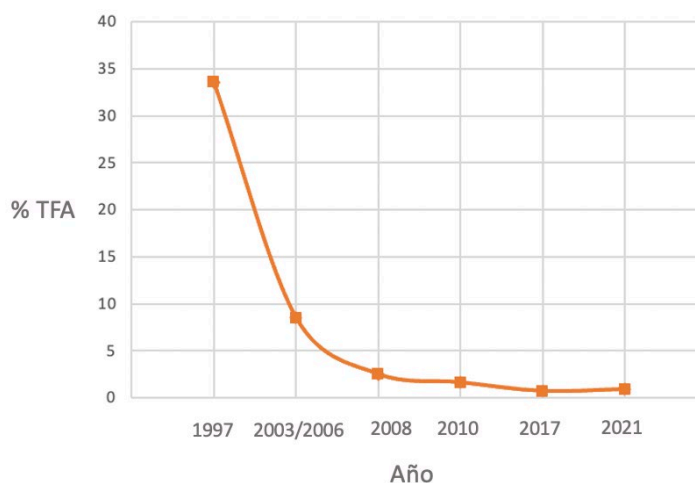


Fig. 10. Línea del tiempo para patatas fritas de comida rápida en España.

4.1.5 Conclusiones

Los resultados obtenidos parecen confirmar la tendencia en los últimos años en España, y en algunos países europeos, como Portugal y Reino Unido, de una reducción de los contenidos de grasa *trans* en alimentos procesados. Reflejan cantidades inferiores al 2 %TFA, sobre grasa total, tal y como estableció de forma pionera Dinamarca y que luego han acogido asociaciones e instituciones internacionales, encabezadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS), la FDA y, más recientemente (desde 2021) la Comisión Europea. Tanto la declaración obligatoria, limitaciones o prohibiciones, la

adopción de buenas prácticas de fabricación y autocontrol, como las reformulaciones para sustituir a los aceites parcialmente hidrogenados, ya periclitados, permitieron el empleo de grasas saludables, interesterificadas o hidrogeles (grasas con bajo nivel de grasa *trans*, grasa saturada, y cantidades adecuadas de ácido linoleico, que contrarrestan a los ácidos grasos *trans*), que resultan eficaces para que se consigan ya, o en un futuro próximo, los objetivos planteados (la OMS se fijó como plazo el año 2023).

No hay que olvidar, en esta batalla contra la grasa *trans*, la presión de los consumidores, a título individual, o a través de sus asociaciones. También, la labor fundamental de los Grupos de Trabajo, creados al efecto para tratar la dimensión del problema, y la predisposición voluntaria de la industria alimentaria, cuando la hubo (por ejemplo, en los Países Bajos y en el Reino Unido ha existido una colaboración a imitar entre la industria y distintos estamentos, que resultó muy positiva).

Han colaborado a los logros conseguidos las buenas prácticas y el autocontrol en la industria, el empleo eficaz de alternativas saludables (fraccionamiento, interesterificación, empleo de hidrogeles y oleogeles), junto a la labor legislativa y de asesoramiento de organismos internacionales y agencias de salud, como FDA, OMS, EFSA y las asociaciones del corazón, en diversos países, como la “American Heart Association”.

Muchas de las reformulaciones acometidas por la industria alimentaria se han introducido bajo patente, y se han ido extendiendo paulatinamente desde el 2003 y, sobre todo, después del golpe de gracia de la FDA a las grasas parcialmente hidrogenadas (foco principal de los ácidos grasos *trans* de origen industrial) en 2013, al no considerarlos ya como sustancias GRAS. Con la introducción de las nuevas alternativas (entre las que se incluyen ceras, hidrogeles y oleogeles) se pretende, en lo posible, descartar el uso como alternativas de los aceites tropicales (de palma, palmiste, y coco), que presentan el inconveniente de la introducción de grasa saturada. Actuando de esta forma se pretende conseguir alimentos procesados de adecuadas propiedades reológicas y organolépticas, estables, de costes reducidos, que no contengan grasa *trans* (o con menos de 1-2 %TFA, sobre grasa total) y con bajo porcentaje de grasa saturada.

La eliminación de la grasa *trans* en los surtidos de alimentos [y aquí nos estamos refiriendo a la de origen industrial, pues la de la leche (lácteos) y carne de rumiantes, en las cantidades que normalmente se consumen en la dieta no parecen ser nocivas] ayudará a reducir, sobre todo en determinados países, la mortalidad y morbilidad por causas

cardiovasculares, además de las desigualdades en expectativas de salud asociadas a los diversos estratos socioeconómicos.

A pesar de que, en promedio, se pueden tener ciertas seguridades, por los bajos contenidos de grasa *trans* en los alimentos procesados ensayados en España, habría que mantener la vigilancia, dada la variabilidad de algunos resultados, y las posibilidades de ocultaciones y empleo de eufemismos (algo que parece darse en algunos países, como Brasil (de Barros *et al.*, 2022); Kenia y Nigeria (Huang *et al.*, 2023).

Otro aspecto importante podría ser la posibilidad de contemplar medidas legislativas para obligar a los productores a declarar obligatoriamente en el etiquetado nutricional la cantidad concreta de contenido de ácidos grasos *trans*, desde 0%; en intervalos de 0,1%. De esta manera, el consumidor recibiría la información adecuada a la hora de seleccionar un producto alimentario para su compra.

CAPÍTULO 4.2:

Determinación de grasa *trans* y parámetros de calidad y autenticidad en aceites vegetales comestibles de oliva, girasol y maíz.

Capítulo 4.2: Determinación de grasa *trans* y parámetros de calidad y autenticidad en aceites vegetales comestibles de oliva, girasol y maíz

4.2.1 Introducción

El aceite de oliva, componente básico de la dieta mediterránea, se ha utilizado tradicionalmente como aderezo usual y aceite culinario en los países mediterráneos, destacando Italia, España y Grecia como grandes productores y consumidores. Su popularidad ha crecido mucho a nivel mundial hasta desplazar a otros aceites comestibles debido a su alto contenido en ácidos grasos monoinsaturados (proverbialmente, el ácido oleico), polifenoles y compuestos bio-activos, de propiedades anti-colesterolemiantes, anti-inflamatorias y antioxidantes (Guasch-Ferré *et al.*, 2022; Jiménez-López *et al.*, 2020). El aceite de oliva contiene 98% de componentes mayoritarios (ácidos grasos, con predominio del oleico, 55-83%), y 2% de componentes minoritarios (triterpenos, polifenoles, esteroides, tocoferoles, carotenoides, quercetina), donde se podrían incluir los ácidos grasos *trans*, originados en las etapas de blanqueamiento y desodorización del proceso de refinación de los aceites vírgenes.

El deterioro hidrolítico y oxidativo puede conducir a la formación de ácidos grasos libres (acidez hidrolítica), hidroperóxidos (oxidación primaria), aldehídos, cetonas, alcoholes, hidrocarburos (oxidación secundaria), que afectan al *flavor* del aceite y originan rancidez. De hecho, las calificaciones “aceite de oliva virgen” y “aceite de oliva virgen extra” sólo se conceden si el índice de peróxidos no supera determinados límites establecidos por la Comisión Europea.

El Consejo Oleícola Internacional (C.O.I), así como la Comisión Europea, a través del artículo 118 del Reglamento (CE) No. 1234/2007 define seis tipos principales de aceites de oliva (que incluyen los aceites de orujo de oliva). Los aceites de oliva vírgenes se caracterizan por obtenerse mediante procesos mecánicos (presión, centrifugación, decantación, filtración y lavado), en condiciones térmicas específicas que no provocan ningún tipo de alteración química. Los valores de acidez más bajos garantizan un aceite de alta calidad, demostrando que se ha obtenido de aceitunas tomadas en su punto óptimo de madurez, libre de lipasas y en condiciones ideales (Malvis *et al.*, 2019).

El aceite de oliva virgen extra es el de mayor calidad, presenta una baja acidez ($\leq 0.8\%$) y un grado sensorial superior a los 6,5 puntos. La elevación de la acidez libre supone degradación hidrolítica, tiene su origen en las lipasas de la pulpa o del hueso de la aceituna y es importante en la etapa de filtración. El índice de peróxidos debe ser, como máximo de 20 meq/kg, aunque las reacciones en cascada de las lipo-oxigenasas procuran notas sensoriales positivas. La extinción específica K_{232} debe ser igual o inferior a 2,50 (indicador de calidad) y la extinción K_{270} igual o inferior a 0,22 (indicador de autenticidad) (Lozano-Castellón *et al.*, 2022).

De las semillas oleaginosas se extraen aceites vegetales, que para su comestibilidad es obligatorio refinar. Las técnicas tradicionales de extracción involucran el uso de prensa mecánica (prensado en caliente o en frío) y la utilización de disolventes orgánicos autorizados que actúan como extractores de grasas y están legalmente limitados sus residuos. Uno de ellos es el aceite de girasol que es ampliamente usado en Europa (en España es el segundo en uso, después del aceite de oliva) y Latinoamérica. Después de la extracción permanece líquido a temperatura ambiente y presenta una vida útil de más de un año, a 10 °C y en la oscuridad (Adeleke & Babalola, 2020). Existen tres modalidades de aceite de girasol: de acuerdo con el porcentaje de ácido oleico que contengan:

- Menor o igual a 54,9%;
- Entre 55,0% y 74,9% (medio oleico);
- Mayor o igual a 75,0% (alto oleico);

El aceite de girasol alto-oleico se obtuvo por selección o modificación genética de las semillas de girasol. Es un aceite de perfil lipídico similar al del aceite de oliva, presenta buena estabilidad térmica (cuando se usa en fritura se forman menos ácidos grasos *trans* que con el aceite de girasol convencional), bajo coste, amplia disponibilidad y difusión. Por su parte, el aceite de maíz podría ser más estable frente a la oxidación por la presencia de ubiquinona y contenidos de α - y β -tocoferoles. Los aceites de orujo de oliva también tienen su mercado. Se extraen agotando los orujos de aceituna (pasta de pulpa, hueso, ramaje) una vez desecados a no muy elevada temperatura, consiguiendo el aceite crudo, que luego experimenta el proceso de refinado para obtener el aceite de orujo de oliva refinado (González-Rámila *et al.*, 2022). El aceite más consumido en los hogares españoles en 2021 fue el aceite de oliva (4,01 L/p/año); seguido por el aceite de girasol

(3,36 L/p/año), y el aceite de oliva virgen extra (3,00 L/p/año), en tercer lugar (MAPAMA, 2022).

En este subcapítulo se determinan parámetros de calidad e identidad, incluidos los ácidos grasos *trans*, de aceites de oliva, girasol y maíz, de distintos tipos y distintas categorías de venta (premium, estándar, marca blanca o de empresa) y se analizan críticamente los resultados obtenidos en base, o tomando como referencia, los valores normativos que para cada uno de los parámetros y cada tipo de aceite ofrece de manera oficial la Comisión Europea, en sus distintas regulaciones. Se discutirán los resultados y se extraerán las conclusiones debidas.

4.2.2 Material y Métodos

4.2.2.1 Reactivos y Aparatos

4.2.2.1.1 Reactivos

- Hidróxido potásico,
- Fenolftaleína,
- Ioduro potásico,
- Tiosulfato sódico,
- Engrudo de almidón,
- Sulfato sódico anhidro,
- Ftalato ácido de potasio,
- Dicromato potásico,
- Ácido acético glacial,
- Etanol 96%,
- Cloroformo,
- Éter etílico,
- Ciclohexano.

Todos los reactivos fueron de pureza y calidad analíticas, de la marca Merck, o similar.

4.2.2.1.2 Aparatos

- Espectrofotómetro de infrarrojos Jasco-FTIR 4200 A, con software QAU-400 Quantitative Analysis Program (Jasco Analytica, Japón).
- Espectrofotómetro UV-visible Shimadzu (Japón), con cubetas de cuarzo de 1,0 cm de paso de luz.
- Refractómetro de Abbe UNICAM WYA-15, termostatzado a 25 °C.
- Balanza analítica Mettler AE100.
- Bureta y material de vidrio para volumetría.
- Viales de vidrio de 10 mL y 20 mL, provistos de tapón de rosca.
- Micropipeta de 1-10 µL.

4.2.2.2 Muestras

Se estudian 23 tipos de muestras de aceites vegetales comestibles de oliva, girasol, y maíz, y de cada muestra-tipo de aceite se escogen tres categorías (premium, estándar, marca blanca) (excepto para el aceite de maíz). Las muestras, codificadas desde la A hasta la W, alfabéticamente, aparecen descritas en la Tabla 16.

Tabla 16. Muestras de aceites vegetales comestibles estudiadas.

Muestra codificada ^a	Tipo de muestra	Categoría
A	Aceite de oliva virgen extra (prensado en frío)	Premium
B	Aceite de oliva virgen extra	Premium
C	Aceite de oliva virgen extra	Estándar
D	Aceite de oliva virgen extra	Marca blanca
E	Aceite de oliva virgen	Premium
F	Aceite de oliva virgen	Estándar
G	Aceite de oliva virgen	Marca blanca
H	Aceite de oliva 1º	Premium
I	Aceite de oliva 1º	Estándar
J	Aceite de oliva 1º	Marca blanca
K	Aceite de oliva 0,4º	Premium
L	Aceite de oliva 0,4º	Estándar
M	Aceite de oliva 0,4º	Marca blanca
N	Aceite de orujo de oliva	Premium
O	Aceite de orujo de oliva	Estándar
P	Aceite de orujo de oliva	Marca blanca
Q	Aceite de girasol	Premium
R	Aceite de girasol	Estándar
S	Aceite de girasol	Marca blanca
T	Aceite de girasol 80% oleico	Premium
U	Aceite de girasol 65% oleico	Estándar
V	Aceite de girasol 26% oleico	Marca blanca
W	Aceite de maíz	Premium

^a Las muestras de aceites de orujo de oliva, aceites de girasol y aceite de maíz son aceites refinados.

Las muestras de aceite se mantuvieron hasta su ensayo en sus envases, a temperatura adecuada, y protegidas de la luz. Las muestras se adquirieron en supermercados o hipermercados o en tiendas reconocidas. Las tres categorías establecidas se fundamentaron, básicamente, en su precio de venta al consumidor. Todos los ensayos se realizaron, después de adquirirlas, lo más pronto posible, se hicieron replicados y, en todos los casos se analizaron antes de su fecha de caducidad.

4.2.2.3 Procedimientos

Índice de acidez

Se disuelven $10 \pm 0,2$ g, exactamente pesados, del aceite en 50 mL de una mezcla éter dietílico-etanol 96 % 1:1 v/v, en matraz Erlenmeyer de 250 mL. Se adicionan 0,15 mL de una disolución de fenolftaleína. Se valora desde la bureta con disolución etanólica de KOH 0,1M (previamente estandarizada con el patrón ftalato ácido de potasio) hasta viraje al rosa del indicador. Se realiza la lectura del valorante gastado hasta la neutralización. Se calcula el índice de acidez, expresado en porcentaje (%) de ácido oleico. Se realiza el ensayo por triplicado.

Índice de peróxidos

En matraz Erlenmeyer de 250 mL, con boca y tapón esmerilado, se pesan, exactamente 2 g de la muestra de aceite. Se añaden 10 mL de cloroformo, y se agita hasta que se disuelva el aceite. Luego, se añaden 15 mL de ácido acético glacial, y 1 mL de disolución acuosa saturada de yoduro potásico. Se tapa el matraz y se agita vigorosamente durante 1 minuto, manteniéndolo 5 minutos en la oscuridad a 15-25 °C. Se añaden 75 mL de agua destilada. Se destapa el matraz, y se valora lo más rápidamente posible, manteniéndolo en agitación, con una disolución, previamente estandarizada, de tiosulfato sódico 0,01 N. Cuando resta poco para llegar al punto final, se añade engrudo de almidón como indicador. Se continúa la valoración hasta decoloración del color azul del aducto iodo-almidón. El resultado se expresa en mEq de oxígeno por kg. Se realizan duplicados.

Índice de refracción

Se utiliza el refractómetro de Abbe. Se filtra previamente la muestra de aceite sobre papel de filtro, que tiene una capa de sulfato sódico anhidro, para eliminar la posible humedad. Las lecturas en el refractómetro se toman con 4 cifras decimales. Hay una temperatura de lectura (t') y una temperatura de referencia (t). La temperatura de referencia es 25 °C: Se corrige el índice de refracción por la diferencia de temperaturas.

Sucedee:

a) Si $t' > t$, $n^{25} = n^{t'} + F (t' - 25)$

b) Si $t' < t$, $n^{25} = n^{t'} + F (25 - t')$

donde F =factor de conversión de temperatura = 0,00035

En los aceites vegetales comestibles puros el intervalo de n^t es 1,4400 – 1,4700.

A 25 °C los rangos de índice de refracción para los aceites ensayados son:

- Aceite de oliva: 1,4665 – 1,4683;
- Aceite de girasol: 1,4706 – 1,4740;
- Aceite de girasol medio oleico: 1,4684 – 1,4705;
- Aceite de girasol alto oleico: 1,4683;
- Aceite de maíz: 1,4710 – 1,4725.

Se realizan duplicados.

Extinciones específicas en el ultravioleta

Antes de realizar las medidas en el espectrofotómetro UV-visible, provisto de cubetas de cuarzo de 1,0 cm de paso de luz, se comprueba la exactitud y precisión del aparato utilizando una disolución patrón de dicromato potásico al 0,2 %, disuelto en disolución de KOH 0,05 N. Su absorbancia a 275 nm, frente a la potasa como blanco de referencia, deberá encontrarse en el intervalo $0,200 \pm 0,005$.

Se pesan, en vaso de precipitado de 50 ó 100 mL, 90 mg de aceites de oliva vírgenes, 60 mg de aceites de oliva refinados, ó 40 mg de aceites de semillas. El aceite debe de estar completamente nítido y transparente; en caso contrario, se requiere una adecuada filtración. Se disuelve el aceite en ciclohexano, se trasvasa a matraz aforado de 10 mL y se diluye y enrasa con ciclohexano. Se mide en el espectrofotómetro UV-visible, en cubetas de cuarzo de 1,0 cm de paso de luz, a 232 nm, 266 nm, 270 nm y 274 nm, utilizando ciclohexano puro como blanco de referencia. La lectura de la absorbancia debe

situarse dentro del intervalo 0,200-0,800. De no ser así, habría que repetir la medida, bien diluyendo convenientemente con ciclohexano puro o bien procediendo a una nueva pesada del aceite y preparación.

La extinción específica ($K_{1cm}^{1\%}$) se calcula a través de la expresión:

$$K_{1cm}^{1\%} = \frac{A_{\lambda}}{c \times e}$$

Donde:

A_{λ} = Absorbancia a la longitud de onda λ ;

c = concentración de la muestra de aceite disuelta en ciclohexano, expresado en gramos por 100 mL de disolución;

e = espesor de la cubeta de cuarzo (1,0 cm).

Determinación de grasa trans

Se utiliza el procedimiento basado en la espectroscopía de infrarrojos de segunda derivada AOCS “Official Method” Cd 14e-09 (AOCS, 2009) que se detalla en el Apartado 4.1.2.5 anterior. Las muestras de aceite se extienden directamente y expanden sobre el cristal ATR, y se lleva a cabo la medida. Se aplica la misma recta de calibrado que se explica en el Apartado “4.1.2.3. Calibración del método”.

Análisis estadístico: Se ofrece la media y la desviación estándar de los resultados. Se calcula el coeficiente de correlación de Pearson. Se utiliza el paquete estadístico SPSS Statistics V. 20 (SPSC Inc., Chicago).

4.2.3 Resultados

Los procedimientos utilizados son los oficializados por la Comisión Europea (CEE, 1991, 1992, 2003) para aceites vegetales comestibles. En los Anexos II y IX del Reglamento CEE No. 2568/91 aparecen los valores normativos para los parámetros y medidas realizadas en las muestras de aceites vegetales comestibles (Tabla 17). Los resultados obtenidos para los distintos parámetros de calidad y autenticidad se recogen en las Tablas 18, 19, 20, 21 y 22.

Tabla 17. Valores normativos de la CEE para los parámetros de autenticidad y calidad de los aceites vegetales comestibles ensayados.

	Aceite de oliva virgen extra	Aceite de oliva virgen	Aceite de oliva	Aceite de orujo de oliva	Aceite de girasol
Acidez (%)	≤ 0,8	≤ 2,0	≤ 1,0	≤ 0,3	≤ 2,0
Índice de peróxidos	≤ 20	≤ 20	≤ 15	≤ 5	≤ 10
K232	≤ 2,50	≤ 2,60		≤ 5,50	
K270	≤ 0,20	≤ 0,25	≤ 0,90		≤ 1,10
ΔK	≤ 0,01	≤ 0,01	≤ 0,15	≤ 0,25	≤ 0,16
n ²⁵	1,4665-1,4683				1,4700-1,4740

	Aceite de girasol 26% oleico	Aceite de girasol 65% oleico	Aceite de girasol 80% oleico	Aceite de maíz
Acidez (%)	≤ 2,0	≤ 2,0	≤ 2,0	≤ 2,0
Índice de peróxidos	≤ 10	≤ 10	≤ 10	≤ 10
n ²⁵	1,4706-1,4740	1,4684-1,4705	1,4683	1,4710-1,4725

Tabla 18. Índice de acidez (% oleico) de los aceites vegetales comestibles ensayados.

Muestra (Código)	Tipo de muestra	Categoría	Índice de acidez (% oleico) (media ± desviación estándar)
A	Aceite de oliva virgen extra (prensado en frío)	Premium	0,164 ± 0,016
B	Aceite de oliva virgen extra	Premium	0,170 ± 0,009
C	Aceite de oliva virgen extra	Estándar	0,210 ± 0,009
D	Aceite de oliva virgen extra	Marca blanca	0,229 ± 0,009
E	Aceite de oliva virgen	Premium	0,205 ± 0,007
F	Aceite de oliva virgen	Estándar	0,263 ± 0,013
G	Aceite de oliva virgen	Marca blanca	0,258 ± 0,009
H	Aceite de oliva 1°	Premium	0,136 ± 0,024
I	Aceite de oliva 1°	Estándar	0,186 ± 0,000
J	Aceite de oliva 1°	Marca blanca	0,318 ± 0,006
K	Aceite de oliva 0,4°	Premium	0,147 ± 0,006
L	Aceite de oliva 0,4°	Estándar	0,105 ± 0,020
M	Aceite de oliva 0,4°	Marca blanca	0,171 ± 0,013
N	Aceite de orujo de oliva	Premium	0,178 ± 0,007
O	Aceite de orujo de oliva	Estándar	0,159 ± 0,007
P	Aceite de orujo de oliva	Marca blanca	0,147 ± 0,007
Q	Aceite de girasol	Premium	0,043 ± 0,007
R	Aceite de girasol	Estándar	0,074 ± 0,006
S	Aceite de girasol	Marca blanca	0,066 ± 0,007
T	Aceite de girasol 80% oleico	Premium	0,062 ± 0,007
U	Aceite de girasol 65% oleico	Estándar	0,097 ± 0,007
V	Aceite de girasol 26% oleico	Marca blanca	0,097 ± 0,007
W	Aceite de maíz	Premium	0,097 ± 0,006

Tabla 19. Índice de peróxidos de los aceites vegetales comestibles ensayados.

Muestras (Código)	Tipo de muestra	Categoría	Índice de peróxidos (mEq O activo/kg) (media ± desviación estándar)
A	Aceite de oliva virgen extra (prensado en frío)	Premium	15,2 ± 3,6
B	Aceite de oliva virgen extra	Premium	21,7 ± 0,6
C	Aceite de oliva virgen extra	Estándar	22,1 ± 1,1
D	Aceite de oliva virgen extra	Marca blanca	17,0 ± 2,4
E	Aceite de oliva virgen	Premium	24,2 ± 3,0
F	Aceite de oliva virgen	Estándar	19,1 ± 0,6
G	Aceite de oliva virgen	Marca blanca	17,8 ± 1,2
H	Aceite de oliva 1°	Premium	15,7 ± 0,6
I	Aceite de oliva 1°	Estándar	12,3 ± 0,6
J	Aceite de oliva 1°	Marca blanca	8,6 ± 0,1
K	Aceite de oliva 0,4°	Premium	14,9 ± 1,8
L	Aceite de oliva 0,4°	Estándar	6,8 ± 1,2
M	Aceite de oliva 0,4°	Marca blanca	6,8 ± 1,2
N	Aceite de orujo de oliva	Premium	3,8 ± 0,6
O	Aceite de orujo de oliva	Estándar	4,2 ± 1,2
P	Aceite de orujo de oliva	Marca blanca	3,4 ± 1,2
Q	Aceite de girasol	Premium	7,2 ± 0,6
R	Aceite de girasol	Estándar	8,9 ± 0,6
S	Aceite de girasol	Marca blanca	37,8 ± 0,6
T	Aceite de girasol 80% oleico	Premium	5,1 ± 1,2
U	Aceite de girasol 65% oleico	Estándar	11,0 ± 0,0
V	Aceite de girasol 26% oleico	Marca blanca	23,8 ± 1,2
W	Aceite de maíz	Premium	6,4 ± 0,6

Tabla 20. Índice de refracción a 25 °C de los aceites vegetales comestibles ensayados.

Muestras (Código)	Tipo de muestra	Categoría	Índice de refracción a 25 °C (media ± desviación estándar)
A	Aceite de oliva virgen extra (prensado en frío)	Premium	$1,4666 \pm 7,0 \cdot 10^{-5}$
B	Aceite de oliva virgen extra	Premium	$1,4669 \pm 2,8 \cdot 10^{-4}$
C	Aceite de oliva virgen extra	Estándar	$1,4670 \pm 2,1 \cdot 10^{-4}$
D	Aceite de oliva virgen extra	Marca blanca	$1,4665 \pm 4,9 \cdot 10^{-4}$
E	Aceite de oliva virgen	Premium	$1,4663 \pm 3,5 \cdot 10^{-4}$
F	Aceite de oliva virgen	Estándar	$1,4673 \pm 2,1 \cdot 10^{-4}$
G	Aceite de oliva virgen	Marca blanca	$1,4668 \pm 9,9 \cdot 10^{-4}$
H	Aceite de oliva 1°	Premium	$1,4669 \pm 0,0000$
I	Aceite de oliva 1°	Estándar	$1,4670 \pm 8,5 \cdot 10^{-4}$
J	Aceite de oliva 1°	Marca blanca	$1,4668 \pm 6,4 \cdot 10^{-4}$
K	Aceite de oliva 0,4°	Premium	$1,4660 \pm 7,1 \cdot 10^{-5}$
L	Aceite de oliva 0,4°	Estándar	$1,4667 \pm 9,2 \cdot 10^{-4}$
M	Aceite de oliva 0,4°	Marca blanca	$1,4663 \pm 7,1 \cdot 10^{-5}$
N	Aceite de orujo de oliva	Premium	$1,4671 \pm 7,1 \cdot 10^{-5}$
O	Aceite de orujo de oliva	Estándar	$1,4676 \pm 7,1 \cdot 10^{-5}$
P	Aceite de orujo de oliva	Marca blanca	$1,4675 \pm 1,4 \cdot 10^{-4}$
Q	Aceite de girasol	Premium	$1,4720 \pm 1,3 \cdot 10^{-4}$
R	Aceite de girasol	Estándar	$1,4719 \pm 1,4 \cdot 10^{-4}$
S	Aceite de girasol	Marca blanca	$1,4718 \pm 0,0000$
T	Aceite de girasol 80% oleico	Premium	$1,4673 \pm 7,1 \cdot 10^{-5}$
U	Aceite de girasol 65% oleico	Estándar	$1,4680 \pm 0,0000$
V	Aceite de girasol 26% oleico	Marca blanca	$1,4699 \pm 1,4 \cdot 10^{-4}$
W	Aceite de maíz	Premium	$1,4712 \pm 4,2 \cdot 10^{-4}$

Tabla 21. Extinciones específicas en el UV de los aceites vegetales comestibles ensayados.

Muestra (Código)	Tipo de muestra	Categoría	K232	K270	ΔK^a
A	Aceite de oliva virgen extra (prensado en frío)	Premium	1,616	0,170	0,00
B	Aceite de oliva virgen extra	Premium	1,940	0,354	0,00
C	Aceite de oliva virgen extra	Estándar	1,824	0,225	0,00
D	Aceite de oliva virgen extra	Marca blanca	2,121	0,272	0,00
E	Aceite de oliva virgen	Premium	1,889	0,272	0,00
F	Aceite de oliva virgen	Estándar	1,998	0,244	0,01
G	Aceite de oliva virgen	Marca blanca	1,683	0,140	0,00
H	Aceite de oliva 1º	Premium	1,956	0,581	0,00
I	Aceite de oliva 1º	Estándar	2,096	0,472	0,04
J	Aceite de oliva 1º	Marca blanca	1,926	0,305	0,04
K	Aceite de oliva 0,4º	Premium	2,185	0,672	0,07
L	Aceite de oliva 0,4º	Estándar	2,007	0,572	0,05
M	Aceite de oliva 0,4º	Marca blanca	1,925	0,395	0,02
N	Aceite de orujo de oliva	Premium	3,626	1,576	0,14
O	Aceite de orujo de oliva	Estándar	3,336	1,252	0,11
P	Aceite de orujo de oliva	Marca blanca	3,363	1,205	0,10
Q	Aceite de girasol	Premium	3,275	2,020	0,21
R	Aceite de girasol	Estándar	3,539	3,479	0,28
S	Aceite de girasol	Marca blanca	3,437	1,481	0,13
T	Aceite de girasol 80% oleico	Premium	1,938	0,936	0,13
U	Aceite de girasol 65% oleico	Estándar	2,669	0,699	0,07
V	Aceite de girasol 26% oleico	Marca blanca	3,409	1,593	0,14
W	Aceite de maíz	Premium	2,633	2,672	0,29

^a $\Delta K = K270 - (K266 + K274) / 2$.

Tabla 22. Contenido de ácidos grasos *trans* en los aceites vegetales comestibles ensayados.

Muestra (Código)	Tipo de muestra	Categoría	% TFA ^a
A	Aceite de oliva virgen extra (prensado en frío)	Premium	0,02
B	Aceite de oliva virgen extra	Premium	0,02
C	Aceite de oliva virgen extra	Estándar	0,05
D	Aceite de oliva virgen extra	Marca blanca	0,05
E	Aceite de oliva virgen	Premium	0,05
F	Aceite de oliva virgen	Estándar	0,05
G	Aceite de oliva virgen	Marca blanca	0,05
H	Aceite de oliva 1º	Premium	2,34
I	Aceite de oliva 1º	Estándar	1,74
J	Aceite de oliva 1º	Marca blanca	1,38
K	Aceite de oliva 0,4º	Premium	0,89
L	Aceite de oliva 0,4º	Estándar	1,27
M	Aceite de oliva 0,4º	Marca blanca	1,19
N	Aceite de orujo de oliva	Premium	0,02
O	Aceite de orujo de oliva	Estándar	0,05
P	Aceite de orujo de oliva	Marca blanca	0,05
Q	Aceite de girasol	Premium	1,93
R	Aceite de girasol	Estándar	1,51
S	Aceite de girasol	Marca blanca	2,19
T	Aceite de girasol 80% oleico	Premium	1,88
U	Aceite de girasol 65% oleico	Estándar	1,36
V	Aceite de girasol 26% oleico	Marca blanca	1,74
W	Aceite de maíz	Premium	1,31

^a Porcentaje (%) de ácidos grasos *trans* sobre grasa total.

De las 23 muestras de aceites vegetales comestibles ensayados, solamente en 7 muestras se incluía en el etiquetado nutricional información de la empresa sobre los parámetros de calidad y autenticidad. No obstante, en estas 7 muestras no se ofrecía ninguna información ni referencia al valor del índice de refracción, ni a contenidos de ácidos grasos *trans* (TFA). En la Tabla 23 se puede comprobar por nuestros datos experimentales que la información ofrecida era correcta. Sin embargo, queda patente que sólo un 30% de los aceites escogidos ha facilitado dicha información, que debería generalizarse.

4.2.4 Discusión

Acidez

Expresa el porcentaje (%) de ácidos grasos libres, expresado en oleico. Representa la calidad sensorial del aceite y refleja las posibles alteraciones debidas a la hidrólisis química o enzimática (lipasas), desde la obtención del fruto o la semilla, hasta las últimas etapas (desodorización) del proceso de refinación de los aceites vegetales. Las lipasas se encuentran presentes en la pulpa o hueso de la aceituna, y en las semillas. Este parámetro puede ofrecer idea sobre el grado de madurez del fruto o la humedad de las semillas oleaginosas. Afectan a este índice la variedad de aceituna, el tipo de semilla, las magulladuras, y las condiciones de almacenamiento en la almazara o en los silos; incluso se ve afectado este parámetro por la permeabilidad del envase y su exposición a la luz (Alvarruiz *et al.*, 2020).

Tabla 23. Parámetros de calidad y autenticidad de los aceites vegetales comestibles ensayados que lo declaran en el etiquetado nutricional.

Muestras de aceites	Acidez (% oleico)		Índice de peróxidos (meq O/Kg aceite)		K232		K270		ΔK	
	Etq ^a	Exp ^b	Etq	Exp	Etq	Exp	Etq	Exp	Etq	Exp
Aceite de oliva virgen extra (marca blanca) (D)	≤ 0,40	0,229	≤ 20	17	≤ 2,50	2,121	≤ 0,22	0,272	≤ 0,01	0,00
Aceite de oliva virgen (marca blanca) (G)	≤ 0,60	0,258	≤ 20	17,8	≤ 2,60	1,683	≤ 0,25	0,140	≤ 0,01	0,00
Aceite de oliva 1° (premium) (H)	< 1	0,136	15	15,7			1,15	0,581	0,15	0,00
Aceite de oliva 1° (estándar) (I)	≤ 1	0,186	≤ 15	12,3			≤ 1,15	0,472	0,15	0,04
Aceite de oliva 0,4° (premium) (K)	≤ 0,4	0,147	≤ 15	14,9			≤ 0,90	0,672	≤ 0,15	0,07
Aceite de oliva 0,4° (estándar) (L)	≤ 0,4	0,105	≤ 15	6,8			≤ 1,15	0,572	0,15	0,05
Aceite de oliva 0,4° (marca blanca) (M)	≤ 0,4	0,171	≤ 15	6,8			< 0,90	0,395	≤ 0,15	0,02

^a Etq= etiquetado; ^b Exp=experimental.

Todas las muestras ensayadas se sitúan de acuerdo con los valores normativos comunitarios para la acidez (Tablas 17 y 18). Se confirma la distribución siguiente:

Tipo de aceite	Acidez (%)
Aceites de oliva vírgenes	0,2 – 0,3%
Aceite de oliva, aceite de orujo de oliva refinado	0,10 – 0,18%
Aceites refinados de girasol y maíz	< 0,10%

En aceite de oliva virgen, la muestra E (premium) presenta menor acidez (mayor calidad sensorial) que las muestras F (estándar) y G (marca blanca). Aceite de oliva 1° (acidez, 0,15 – 0,32%) y aceite de oliva 0,4 ° (acidez 0,10 – 0,18%) cumplen con lo declarado en la etiqueta, siendo el valor experimental obtenido menor que el declarado (CEE, 1992). En la muestra de aceite de oliva 1°, la acidez es mayor en la marca blanca (muestra J). Sin embargo, de las tres muestras de aceite de orujo de aceituna refinado, la marca blanca (muestra P), perteneciente a una cadena de hipermercado extranjera, es la que presenta menor acidez.

La categoría “aceite de oliva” es una mezcla, a criterio del productor, de aceite de oliva refinado y aceite de oliva virgen. Este último suele aparecer en un porcentaje del 20% ó del 25% en la mezcla con el refinado. De todas las muestras aquí estudiadas, sólo uno de ellos declaraba este porcentaje (20% de aceite de oliva virgen) (muestra M). Conforme mayor sea la aportación de aceite de oliva virgen a la mezcla, mayor será la acidez del “aceite de oliva”. Así, las muestras J y M, ambas marcas blancas o de empresa (Tabla 18), se intuye que contienen un mayor aporte (%) de aceite de oliva virgen, y menor aporte (%) de aceite de oliva refinado.

Las muestras de aceites refinados de girasol y de maíz son las de menor acidez entre todas (la refinación elimina los ácidos grasos libres, que causan “olores extraños” (*off-flavors*)), es menor de 0,15 %, lo que está de acuerdo con lo indicado en el Código Alimentario Español (CAE).

Índice de peróxidos

Se calcula mediante una iodometría, y se expresa en miliequivalentes de oxígeno activo por kg de aceite. Viene a indicar el grado de oxidación incipiente en la muestra de aceite. Los resultados aparecen en la Tabla 19. En general, se cumplen los valores normativos (Tabla 17), salvo tres excepciones que comentaremos.

Se observan valores más altos en los aceites de oliva virgen que en los aceites de oliva refinados, como consecuencia de la acción prooxidante de los pigmentos carotenoides (415, 455, 485 nm) o las clorofilas (610, 670 nm) (Lozano-Castellón *et al.*, 2022). Por otra parte, la muestra de aceite de oliva virgen extra prensado en frío (muestra A) ofrece un menor índice de peróxidos que los otros aceites vírgenes, lo que demuestra su menor inclinación a la alteración oxidativa.

Una marca blanca de aceite de girasol refinado (muestra S) presentaba un índice de peróxidos muy alto (mayor de 35), que coincidía con un valor extralimitado para el parámetro K270 (mayor que 1,10). Se podría diagnosticar que presenta síntomas de oxidación. En otra muestra de aceite de girasol enriquecido en oleico (muestra V) se sobrepasaba, por poco, el índice de peróxidos, que coincidía con un valor de K270 superior a 1,10 y con un valor del índice de refracción, a 25 °C, por debajo del normativo: se trataba de un aceite destinado a frituras, y es sospechoso de oxidación incipiente. También es sospechosa una muestra premium de aceite de oliva virgen (muestra E) que ofrecía un índice de peróxidos de 24,2 y una K270 de 0,272 (que es mayor que 0,25, el valor normativo).

Índice de refracción (n^{25})

Todos los valores experimentales de este índice caen dentro de lo que exige la normativa comunitaria para los aceites vegetales comestibles (Tabla 20). Hay una excepción, y se trata de la muestra de aceite de girasol refinado enriquecido con 26% de ácido oleico (muestra V) que muestra un índice por debajo del valor normativo. Coincide con un valor de índice de peróxidos superior a 20, y ya nos hemos referido a esta circunstancia.

Extinciones específicas en el UV: K232, K270, ΔK

Las extinciones (absorbancias) específicas a determinadas longitudes de onda del espectro ultravioleta ofrecen idea sobre el estado oxidativo incipiente de las muestras. Representan tanto a los dienos conjugados, como a los hidroperóxidos formados, primera fase del proceso oxidativo lipídico. Proporcionan información sobre:

- Grado de calidad;
- Estado de conservación;
- Cambios en los procesos tecnológicos, desde la recogida y extracción del aceite, hasta el proceso de refinación de este.

Como se observa en la Tabla 21, se cumple que K232 es mayor en aceites vegetales refinados, pues este parámetro aumenta durante la etapa de blanqueamiento (Passaloglou-Emmanouiliden, 1990). También una mala conservación de las aceitunas, como una extracción con disolventes (*n*-hexano) defectuosa desde la semilla oleaginosa, influyen en este parámetro K232.

El parámetro K270 viene a representar a los trienos conjugados y a productos de la oxidación secundaria (aldehídos y cetonas insaturados), resultantes de la descomposición de los hidroperóxidos. Una mala praxis en las etapas de blanqueamiento y desodorización eleva el valor que adquieren K270 (Endo, 2018).

En los aceites de oliva vírgenes no se encuentran valores anormales de K270 (Tabla 20), por lo que se descarta adulteración de estos aceites con aceites refinados, más baratos. Una muestra de aceite de oliva virgen extra (muestra B) presenta un valor K270 >0,3, supera al normativo, y esto coincide con un índice de peróxido en el límite normativo. Otra muestra de aceite de girasol, marca blanca, presenta un K270=1,481 (muestra S, superior al normativo para este tipo de aceite (1,10), coincidiendo también con un índice de peróxidos muy alto (37,8). Ambas muestras muestran síntomas de oxidación lipídica, más acentuado en la segunda.

ΔK de todos los aceites ensayados se encuentra dentro de los valores normativos, excepto dos muestras de aceite de girasol refinado (Q y R), y la muestra de maíz refinado (W) (Tabla 21). Con referencia al “aceite de oliva”, las muestras de aceite de orujo de oliva refinado presentan un ΔK un poco superior (aunque para ambos tipos de aceite ΔK

está dentro de los valores normativos). Esto se debe a la desecación previa con turbina de aire caliente del orujo de aceituna, que antecede a la extracción con *n*-hexano.

Aceite de oliva virgen extra prensado en frío

Es el aceite obtenido por procedimientos mecánicos suaves, como prensado o centrifugación, de la materia prima, además de lavado y filtrado. Se pueden tratar con corriente de vapor, pero a menos de 40 °C y presión reducida. No se pueden neutralizar, blanquear, ni desodorizar. Tienen un mayor coste, debido a la necesidad de emplear más materia prima, y al tipo de tecnología empleada (Brühl, 1995). Los aceites prensados en frío han llegado a alcanzar en algunos países, como Alemania, la mayor cuota de mercado entre los aceites nativos. Presentan un *flavor* típico, un color más intenso que el del aceite de oliva convencional y el aceite de orujo de oliva, a pesar de una menor vida comercial (Brühl, 1996).

La muestra A, de aceite virgen extra de oliva prensado en frío declaraba una acidez inferior al 0,2%, y su acidez calculada fue 0,164%. Es la más baja de todos los aceites de oliva vírgenes ensayados, lo que ofrece idea de su elevada calidad sensorial. Además, presenta el valor más bajo de índice de peróxidos (15) entre todos los aceites nativos ensayados, y bajos valores para las extinciones específicas en el UV (K232, K270, ΔK) (Tablas 18, 19 y 21).

Aceites de orujo de oliva refinados

Estas muestras satisfacen todos los valores normativos para los índices de calidad y autenticidad, y sólo contienen cantidades trazas de grasa *trans* (menos de 0,1 % TFA, sobre grasa total). Se confirman como de muy buena calidad, a pesar de emplear calor en la desecación industrial del orujo de oliva y en el acondicionamiento del proceso de extracción con *n*-hexano. Se trata de las muestras N, O, P, que han sido sometidas, sin duda, a muy buenas prácticas de fabricación (incluida la marca blanca) (Tablas 18, 19, 21 y 22). A pesar de esto, el aceite de orujo de aceituna no es de los más consumidos por la población, en parte por cierto prejuicio injustificado.

Aceite de girasol refinado – 80% oleico

En 1994, la identificación y clonación del gen FAD₂ (que codifica la enzima de entrada en la biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), proporcionó las

herramientas necesarias para diseñar líneas de cultivo de plantas de oleaginosas con alto contenido en ácido oleico y bajo contenido de PUFAs. De esta forma se diseñaron como nuevos productos los aceites de girasoles enriquecidos en ácido oleico.

Se ha evaluado el aceite de girasol refinado -80% oleico (muestra T, premium), que presentaba buenos resultados en sus parámetros de calidad (Tabla 24):

Tabla 24. Parámetros de calidad aceite de girasol refinado 80% oleico.

Parámetro	Valor experimental	Valor normativo
Acidez	0,062%	≤ 2,00%
Índice de peróxidos	5,1	≤ 10
K270	0,936	≤ 1,10
ΔK	0,13	0,16

El aceite de girasol enriquecido en ácido oleico se ha recomendado por combinar las propiedades del aceite de oliva y del aceite de girasol, para su uso en frituras (progresan menos los ácidos grasos *trans*) y para la salud cardiovascular (González-Rámila *et al.*, 2022).

Ácidos grasos *trans*

Como se observa en la Tabla 22, las muestras de aceites de oliva virgen ensayadas (muestras A hasta G) sólo presentan cantidades trazas (< 0,1%) de ácidos grasos *trans*, como era de esperar. Las otras muestras que sólo contienen trazas de grasa *trans* son las de aceite de orujo de oliva refinado (N, O, P). Las muestras de aceite de oliva 1° presentaban valores en el tramo 1-2%, mientras que las de aceite de oliva 0,4° tenían valores más bajos, alrededor del 1%. En los aceites refinados de girasol y de maíz los valores obtenidos fueron de 1-2%, aunque menores en los aceites de girasol enriquecidos en ácido oleico. Las muestras no superan (salvo la muestra H, de aceite de oliva 1°, la cual sobrepasaba ligeramente el valor normativo del índice de peróxidos, y la muestra S de aceite de girasol, marca blanca, con claros indicios de alteración oxidativa, por sus valores elevados tanto de índice de peróxidos (>30) como de K270) el límite del 2%TFA,

sobre grasa total, marcado por Dinamarca desde el 2004, y por la legislación comunitaria más recientemente, desde 2021.

Está bien demostrado que durante el proceso de refinación de los aceites vegetales para lograr su comestibilidad se forman ácidos grasos *trans*. Pero, además, estas sustancias se pueden formar en el pretratamiento de la materia prima (aceitunas, semillas oleaginosas) y/o durante su almacenamiento. Los valores de grasa *trans* que se han obtenido coinciden con los suministrados por otros autores. Wolff (1992) en muestras francesas de aceites comestibles de soja encontró un rango de valores de 0,16-2,99 %TFA (los aceites de soja y colza, debido a la presencia de ácido α -linolénico presentan valores más elevados de grasa *trans*) y el 72% de las muestras superaban el 1 %TFA.

En muestras de aceites vegetales comestibles centroeuropeas se obtuvo un rango de 0,26-1,61 %TFA (De Greyt *et al.*, 1999). Aunque la Agencia Francesa de Seguridad Alimentaria (AFSSA) y la Comisión Europea (CEE, 1991, 1992) recomendaran que en un aceite vegetal refinado no se debería sobrepasar el 1 %TFA, sobre grasa total, la realidad fue que en el control de muestras realizado por el Instituto Francés de estudio de la materia grasa se encontró un rango de 0,3-1,8 %TFA (Morin, 2005). Los valores obtenidos de TFA en aceite de maíz refinado (Tabla 22) aparecen dentro del rango 1,2-1,4 %TFA encontrado por otros autores (da Costa Filho, 2014).

La carga de isómeros *trans* va a depender de distintos factores, como son:

- Temperatura y tiempo de estancia en la cámara de blanqueamiento y en el desodorizador;
- Diseño y geometría del desodorizador
- Un calentamiento no homogéneo;
- Una mala recirculación interna del aceite que se refina.

Si se utilizan tierras decolorantes activadas al ácido y una temperatura en el desodorizador que exceda los 240 °C, la probabilidad de que se supere el 1 %TFA, sobre grasa total, en el aceite refinado es grande (Sherazi *et al.*, 2009). Pero la carga de ácidos grasos *trans* se puede rebajar si en la etapa de blanqueamiento con tierras decolorantes, en vez de carbón activo, no se sobrepasan los 85 °C, y en el desodorizador no hay una estancia superior a las 2-3 horas; en ensayo piloto se ha comprobado que al pasar de 3 horas a 6 horas de estancia en el desodorizador se duplicaban las cantidades de ácidos grasos *trans* (León-Camacho *et al.*, 1999).

En los aceites de semilla, las semillas oleaginosas de las que se ha de extraer el aceite vegetal se tratan previamente a 100 °C, para desecarlas, favorecer la extracción con disolventes y eliminar las lipasas, que poseen efecto hidrolítico. Si esta operación no se controla adecuadamente, el efecto del calor puede incidir en un aumento de los ácidos grasos *trans* (Tasan *et al.*, 2011). También influye la calidad de las semillas y sus condiciones de almacenamiento.

En la refinación física (que sustituyó en muchas plantas de refinación de aceites vegetales a la primitiva refinación química) se evita la etapa de neutralización de los ácidos grasos libres, adquiriendo más protagonismo la etapa de desodorización, donde se hace necesario aumentar la temperatura unos 20-30 °C, con respecto al proceso de refinación química. Había que reducir la presión dentro del desodorizador, pero esta operación presentaba dificultades técnicas y hubo que aumentar la superficie de contacto entre el vapor de agua, que arrastra la acidez libre, y el aceite que recircula (Tasan & Demirci, 2003).

Indudablemente, la refinación física tiene sus ventajas respecto al proceso químico, como un aumento de la eficacia y reducción de la polución ambiental. Pero si la temperatura en el desodorizador superaba el umbral de los 240 °C, se podían formar nuevos artefactos como polímeros no polares de triacilglicerol (oligómeros) que se correlacionaban con los ácidos grasos *trans* formados por efecto de las altas temperaturas (De Greyt *et al.*, 1999; Ferrari *et al.*, 1996). Se debe, por tanto, escoger una solución de compromiso. Así, se deben elegir temperaturas en el desodorizador lo suficientemente altas para que destilen y se volatilicen los llamados “olores-sabores extraños” (“*off-flavors*”) pero que a la vez sean lo suficientemente suaves como para que no se formen ácidos grasos *trans* y no se produzca isomerización geométrica por efecto de las temperaturas muy altas.

En las etapas de blanqueamiento y desodorización la isomerización geométrica afecta, fundamentalmente, a los ácidos grasos insaturados linoleico y α -linolénico. En el caso de los aceites que aquí se estudian, es el ácido linoleico, presente en cierta extensión en los aceites de girasol y de maíz, el que puede sufrir dicha isomerización ya que estos aceites tan sólo contienen cantidades traza (<0,1 %) de ácido α -linolénico. Los isómeros posicionales y geométricos son en un 90% *trans*-18:2. La isomerización del ácido oleico hasta *trans*-18:1 (fundamentalmente, ácido elaídico) no suele observarse, bajo las condiciones normalmente establecidas en la etapa de desodorización. La reacción

isomérica sigue un mecanismo de primer orden, y la constante cinética (k) varía con la temperatura de acuerdo con la ecuación de Arrhenius (Hénon *et al.*, 1999; Schwarz *et al.*, 1995).

En la refinación física, si se quieren evitar cifras más elevadas de ácidos grasos *trans*, es más conveniente desacidificar en el desodorizador empleando como fluido de arrastre vapor de agua mejor que nitrógeno (Bada Gancedo *et al.*, 2002; León Camacho *et al.*, 1999).

En muestras de aceite de girasol refinado en la India (este aceite es el más usado en estos lugares, cuando no acuden al uso del vanaspati), la mayoría presentaban valores de TFA en el rango 2 – 4,4%, sobre grasa total, superando pues el límite del 2% que rige en Europa. Los aceites los suelen importar crudos, y luego los refinan en el país, exceptuando la palmitoleína, el más económico, pero que contiene < 1%TFA. Hay que tener en cuenta que contribuyen a que aparezcan estos niveles más altos de TFA:

- Un defectuoso proceso de refinación, con el empleo de temperaturas demasiado elevadas en las etapas de blanqueamiento y desodorización;
- Uso de álcalis;
- Equipamiento metálico ya anticuado y muy usado (Amrutha Kala, 2012).

Diversos estudios han demostrado que, si no se optimiza el proceso de refinación y, sobre todo, si se aplica la refinación física resulta difícil mantener los niveles de ácidos grasos *trans* en el límite del 1 %, como pretende la legislación europea (CEE, 1991) en los aceites refinados, salvo que se optimice y regule de manera oficial las etapas de blanqueamiento y desodorización en el proceso general de refinación de los aceites vegetales. Diversas asociaciones europeas e internacionales propusieron a la Comisión Europea guardar cierta tolerancia y establecer el límite en aceites vegetales refinados en 2 %TFA, sobre grasa total, que, en realidad es lo que se ha legislado para todos los alimentos.

Con las muestras ensayadas se ha intentado establecer posibles correlaciones entre los niveles de grasa *trans* encontrados en estos aceites vegetales y los otros parámetros de calidad y autenticidad. Se han obtenido los siguientes resultados (Tabla 25):

Tabla 25. Nivel de correlación entre el %TFA en las muestras de aceites vegetales ensayadas y los parámetros de calidad y autenticidad.

Tipo de correlación	Coefficiente de correlación (r) de Pearson
%TFA vs K270	0,3854
%TFA vs n ²⁵	0,4699
%TFA vs índice de acidez	0,5964

En las muestras de aceites de oliva virgen extra se cumple que $K232 \leq 2,50$, lo que es indicio de calidad. Pero la muestra B presenta un valor $K270=0,354$ (alto), y podría ser sospechosa de adulteración con aceites refinados más económicos. El parámetro K270, coordinado con el índice de peróxidos, podría insinuar indicios de oxidación incipiente y esto podría provenir de una mala praxis en las etapas de desodorización y blanqueamiento (proceso de refinación). Existe una cierta correlación, aunque no es muy significativa, entre K270 y formación de ácidos grasos *trans* ($R \approx 0,40$). Dado los niveles de %TFA que se han obtenido en los aceites refinados, parece que en las refinerías de aceite han optado por la refinación física, más eficiente energéticamente que la química, pero que necesita de un estricto control de las temperaturas y tiempo de tratamiento en el desodorizador, y evitar superar los 240 °C y las 3 horas, a riesgo de la formación de ácidos grasos *trans* y de oligómeros.

También se ha apreciado cierta correlación entre la formación de ácidos grasos *trans* y el valor del índice de refracción (n^{25}) ($R = 0,4699$). En una muestra (V) de aceite de girasol con oleico, con un índice de peróxidos > 20 , el valor de n^{25} estaba por debajo de su valor normativo correspondiente.

Si exceptuamos las muestras H, I, J, de aceite de oliva 1º, en general, hay una correlación inversa ($R \approx - 0,6$) entre acidez y presencia de ácidos grasos *trans* (Tablas 18 y 22). Así, las correspondencias (Tabla 26):

Tabla 26. Correlación inversa entre acidez y %TFA en aceites vegetales ensayados

Tipo de aceite	% Acidez	%TFA
Aceites de oliva vírgenes	0,2 - 0,3%	0,0 – 0,05%
Aceites de oliva 0,4 ° y aceites de orujo de oliva refinado	0,10 – 0,18%	0,05 – 1,3%
Aceites de girasol y de maíz refinados	< 0,10%	1,3 – 2%

CAPÍTULO 5:

Incidencia de cáncer de mama asociado a las ingestas de grasa *trans*: meta-análisis de estudios caso-control

Capítulo 5: Incidencia de cáncer de mama asociado a las ingestas de grasa *trans*: meta-análisis de estudios caso-control

Durante todo el procedimiento y relato que se sigue se aplican directrices propuestas por el sistema PRISMA (“Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analysis”) (Urrutia & Bonfill, 2010).

5.1 Introducción

El cáncer de mama es el principal tipo de cáncer diagnosticado en mujeres españolas (Galcerán *et al.*, 2017). En la génesis pueden encontrarse grasas específicas. Así, un consumo elevado de ácidos grasos omega-6 y grasas *trans* se ha asociado con un mayor riesgo en mujeres post-menopáusicas (Sczaniecka *et al.*, 2012). Por lo tanto, una dieta poblacional con una carga importante de grasa *trans* puede afectar al desarrollo de este tipo de cánceres (Stepien *et al.*, 2016).

Los primeros ensayos para investigar la posible asociación entre la grasa *trans* y el cáncer se llevaron a cabo en modelos animales, pero los resultados se tomaron con cautela y se consideró que no eran muy representativos debido a las concentraciones desmesuradas de ácidos grasos *trans* que se empleaban en los ensayos.

En 1990, a partir de la confirmación del ascenso de colesterol total y LDL-C séricos por ingestas de grasa *trans*, los trabajos se focalizaron más en la relación entre la grasa *trans* y las enfermedades cardiovasculares. Paralelamente se diseñaron estudios epidemiológicos y experimentales en torno a una posible asociación entre la carga de grasa *trans* y la incidencia de cierto tipo de cánceres, centrándose, sobre todo, en los de colon, próstata y mama.

En la base de los mecanismos se encuentra, por una parte, la alteración en presencia de ácidos grasos *trans* de la desaturación y elongación de la cadena de los ácidos grasos esenciales hasta los metabolitos PUFAs de cadena larga. El ácido graso *trans* compite por las desaturasas y puede reducir la producción de eicosanoides de serie-3. Al mismo tiempo, suben los márgenes de factores pro-inflamatorios, y radicales libres, y en algunos modelos experimentales se ha asociado la presencia de grasa *trans* con roturas y disfunciones cromosómicas (Kohlmeier *et al.*, 1997).

Los estudios caso-control, elegidos para el meta-análisis en el presente capítulo con respecto a los de cohorte prospectivos, son estudios a más corto plazo, requieren menos participación, y son menos costosos. La evidencia que se podría perder por un seguimiento más corto y una menor participación se puede compensar con la potencia que concede la utilización de controles sanos en las mismas condiciones del ensayo y la certeza de obtener evidencias a corto plazo.

El meta-análisis combina y relaciona estadísticamente datos experimentales a través de los estudios incluidos en el mismo, con el objetivo de estimar y cuantificar el efecto de exposición, con una precisión y confiabilidad mayor que las que son posibles con un único estudio. El meta-análisis que se desarrolla en este Capítulo 5 tiene como objetivo evaluar la posible asociación entre la ingesta de grasa *trans* y el riesgo de incidencia de cáncer de mama, en colectivos de mujeres de distintos países, etnias y edades, manejando estudios representativos caso-control. Es importante para la enfermedad que el meta-análisis cubra una amplia perspectiva (Gotzsche, 2000). Se sigue la estrategia de la declaración PRISMA, desarrollada por primera vez en 2009 (Moher *et al.*, 2009).

5.2 Metodología

5.2.1 Elegibilidad. Extracción de datos

Se llevó a cabo una exhaustiva revisión bibliográfica en las bases de datos:

- PubMed;
- Embase;
- Scopus;
- SciFinder;
- Web of Science;

entre los años 1995 y 2020. Los términos de búsqueda en las bases de datos citados fueron:

- “*trans* fatty acids” AND “breast cancer”;
- “*trans* fat” AND “breast cancer”;
- “*trans* fatty acids” AND “breast cancer morbidity”;
- “industrial” AND/OR “ruminant *trans* fatty acids” AND “breast cancer”.

Se usaron los mismos términos de búsqueda en todas las bases de datos exploradas.

Las citas bibliográficas seleccionadas se revisaron por título, autores y localización para comprobar si había duplicaciones. Una vez eliminadas las duplicaciones se revisaron por título y resumen para ver cuáles eran potencialmente elegibles.

En una revisión final se revisaron a texto completo y nos centramos en los artículos de investigación (no se tienen en cuenta comunicaciones breves, revisiones sistemáticas, procedimientos de congresos y otras reuniones científicas, patentes). Se decidió cuáles eran los estudios que se integrarían finalmente en el desarrollo del meta-análisis. Se evitaron datos troceados de diferentes publicaciones sobre el mismo estudio. Los artículos de investigación escogidos debían estar redactados en inglés, español, francés o italiano.

5.2.2 Criterios de exclusión

Se excluyeron:

- estudios con animales, líneas celulares, o células madre;
- estudios de cohorte prospectivos, ensayos controlados aleatorizados, ensayos clínicos;
- estudios sin una población control adecuada;
- estudios que no presentaran expresión cuantitativa del efecto de exposición;
- poblaciones con deficiente estado de salud;
- estudios con menos de 6 meses de seguimiento.

Las consecuencias de la exposición a la grasa *trans* se tomaron sobre la base de:

- autoinforme;
- informe médico especializado;
- importancia biológica y clínica en relación con el desarrollo del cáncer de mama.

5.2.3 Riesgo de sesgo (calidad del estudio)

El tamaño del efecto puede variar de acuerdo con la calidad metodológica del estudio. Dicha calidad está en función de la ausencia de sesgos en los estudios. El investigador puede que no obtenga toda la información disponible, por defectos en la búsqueda: sería un sesgo de recuperación. O el investigador puede que no obtenga toda la información porque se publiquen unos resultados y otros no: se trataría de un sesgo de publicación. A todo esto, habría que añadir los estudios no publicados, lo que se conoce

como “literatura gris” (tesis doctorales, comunicaciones a congresos, informes de agencias gubernamentales, comunicaciones privadas).

¿Qué otros parámetros pueden provocar sesgos? Entre otros:

- la existencia de participantes a los que no se asignen consecuencias (patologías), actuando como si en realidad hubieran sido asignadas;
- la incidencia de un cierto porcentaje de pérdidas (falta de control) en el seguimiento del estudio;
- detención prematura del estudio, con la intención de obtener un resultado beneficioso;
- cometer errores en la extracción de datos;
- posibles diferencias percibidas entre sub-grupos del estudio;
- la adopción de información selectiva;
- la no inclusión de algunos estudios cuyos resultados no eran estadísticamente significativos;
- fijar la atención sólo en estudios que se creen más relevantes.

La calidad de un meta-análisis expresa, pues, la confianza en la estimación del efecto de exposición o tratamiento.

Existen diversas estrategias para evaluar el riesgo de sesgo. La “Newcastle-Ottawa Scale” (NOS) y la escala NutriGrade pueden utilizarse para determinar la calidad de los estudios definitivamente implicados en el meta-análisis.

En la presente Tesis haremos uso de una de ellas, la más extendida: se trata de la escala NOS, diseñada para estudios no aleatorios (Gebauer *et al.*, 2007). Este método consiste en otorgar un máximo de 9 “estrellas” (puntos) posibles a cada uno de los estudios:

- 4, por selección en la definición y representatividad de casos y controles;
- 2, por control de estudios por variables (factores de confusión);
- 3, para evaluación de los resultados.

A cada ítem se le asignan 0, 1, 2 estrellas, y luego se suma. A mayor puntuación, mayor calidad del estudio, y menor riesgo de sesgo.

Un método generalizado y sencillo para evaluar la posible existencia de sesgo sería el uso del gráfico en embudo (“funnel plot”) (Sterne & Egger, 2001). Se representa la magnitud del efecto de exposición a la grasa *trans* (log OR) frente a una medida de la

precisión como podría ser el error estándar. Se representa cada estudio primario por un punto, y se observa la nube de puntos. Si la distribución de los puntos es simétrica, esto indicaría ausencia de sesgo. Por el contrario, si esta distribución de los puntos (que representaban a los estudios bajo meta-análisis) es asimétrica, sería distintivo de la existencia de sesgo. La asimetría podría indicar:

- estudios que no se reflejaron en el meta-análisis;
- información incompleta dentro de los estudios reseñados;
- omisión de estudios pequeños con resultados negativos;
- diferencias en la calidad de los estudios.

La prueba gráfica del embudo es, sobre todo, una prueba visual y hay que confirmarla mediante la prueba gráfica de Egger. Esta prueba es más específica que la de Begg (que calcula el estadístico Z y el valor p). Consiste en la representación de la precisión (la inversa del error estándar) (variable independiente) frente al efecto estandarizado (variable dependiente), y ajuste de la recta de regresión (Egger *et al.*, 1997).

5.2.4 Heterogeneidad

La heterogeneidad refleja el porcentaje (%) de variabilidad entre los estudios que no se puede explicar por el error de muestreo aleatorio sino por características diferenciales de los estudios implicados. Se denomina inconsistencia al porcentaje (%) de variabilidad total a través de los estudios, como consecuencia de la heterogeneidad.

Para calcular la heterogeneidad se empleó, en un principio, la prueba Q-Cochrane, o prueba del estadístico “chi-cuadrado”, cuando se trataba de menos de treinta estudios (Dersimonian & Laird, 1986). Un valor “chi-cuadrado” superior a los grados de libertad, o un estadístico $p < 0,05$ indicaría la existencia de heterogeneidad en el meta-análisis de los estudios finalmente seleccionados.

Hay que tener en cuenta que si el número de estudios considerados es bajo (menos de diez, en nuestro caso), desciende la capacidad para detectar heterogeneidad (baja potencia de contraste). En estos casos es preferible emplear el estadístico, o índice I^2 , universalmente utilizado. El índice I^2 no depende del número de estudios, e indica variabilidad entre los estudios, más allá del azar. A continuación, se ajustan los valores de I^2 (Tabla 27):

Tabla 27. Índice I^2 y grado de heterogeneidad.

Valor de I^2	Grado de heterogeneidad
< 25%	no hay
26-50%	moderada
>75%	alta

Si el índice de I^2 es bajo ($I^2 < 25\%$), el estadístico p es alto, y viceversa (Higgins & Thompson, 2002).

5.2.5 Síntesis de resultados. Modelos de efectos fijos y efectos aleatorios

En los estudios caso-control el tamaño del efecto (síntesis cuantitativa) viene representado por el estadístico “cociente de probabilidades” (“odds ratio, OR”). Se calcula el OR más ajustado, y su correspondiente intervalo de confianza (95% IC), tomando en consideración el mayor número de co-variables que actúan como factores de confusión. Se trata de una medida cuantitativa de la asociación entre los niveles ingeridos de grasa *trans* por la población y el riesgo de padecer cáncer de mama.

Para el análisis de los resultados se pueden emplear dos tipos de modelos (Hunter & Schmidt, 2000):

Modelo de efectos fijos

Las diferencias entre los resultados de los estudios reflejarían variaciones aleatorias. Sólo podría existir variabilidad “dentro del estudio”. Aparecen intervalos de confianza más estrechos, lo que denota mayor precisión.

Modelo de efectos aleatorios

La variabilidad entre los resultados refleja cambios asignables a las particularidades de los estudios: existiría variabilidad “entre los estudios”. Cada estudio presenta un efecto paramétrico propio, diferenciándose entre ellos.

La elección entre ambos modelos dependerá del valor del índice I^2 . En ausencia de heterogeneidad entre los estudios ($I^2 < 25\%$), coincidirían prácticamente las estimaciones

por ambos modelos. En caso de una alta heterogeneidad sería contradictorio aplicar el modelo de efectos fijos.

Diagrama de bosque (“forest plot”)

Los resultados cuantitativos del meta-análisis se ofrecen a través del diagrama de bosque (Lewis & Clarke, 2001). Este diagrama presenta los estudios acumulados que constituyen el bosque, donde los árboles son los estudios primarios incluidos en el meta-análisis. Cada estudio se representa por un cuadrado, cuya área es proporcional a su contribución al resultado global.

El cuadrado se sitúa sobre una línea, que representa en la escala el intervalo de confianza: mientras menor sea este intervalo, mayor precisión tendrá el estudio. El resultado global (100% de ponderación) se representa en el diagrama por un rombo, cuyo centro indica su estimación puntual, y su amplitud, el intervalo de confianza.

OR, razón de probabilidades, es una medida confiable de la consecuencia (cáncer de mama) del efecto de exposición (ingestas de grasa *trans*). OR, al igual que RR (ratio de riesgo) miden efectos relativos de la exposición (población objeto vs población control), y es más consistente que RD (diferencia de riesgo), que mide tamaños del efecto absolutos. Los paquetes estadísticos estándares facilitan el diagrama de bosque a partir del 2002.

5.2.6 Análisis adicionales

Dentro de los análisis adicionales se consideran el análisis de sensibilidad y el análisis de subgrupos. Ambos nos ayudan a comprobar si los resultados obtenidos son robustos.

5.2.6.1 Análisis de sensibilidad

Se puede examinar la influencia que pudiera ejercer un estudio primario sobre la estimación del OR global. Este análisis está relacionado con la estabilidad de la medida final obtenida (Fleiss, 1993).

El análisis de sensibilidad consiste en la repetición del meta-análisis tantas veces como estudios se han seleccionado definitivamente, de forma que cada vez se omite un estudio, combinándose todos los restantes. Se trata de la estrategia “omitir uno” o “dejar uno fuera”.

Si los resultados de los distintos meta-análisis presentan un efecto en una misma dirección, magnitud y significación estadística, se podría concluir que los resultados son robustos. Si algún o algunos resultados se desvían de la tendencia general del efecto, habría que esgrimir posibles causas para que se dé esta desviación. Incluso en el caso en que la magnitud del efecto se desvíe lo bastante, por exceso o por defecto, del resultado global, habría que plantearse si incluir o no dichos estudios en el meta-análisis globalizado. Se considerará un caso atípico o estudio espurio cuando el estudio omitido altere el tamaño del efecto un 10% o más.

5.2.6.2. Análisis de subgrupos

Esta herramienta puede servir para identificar fuentes, o focos potenciales de heterogeneidad, a través de una estratificación. Dicha estratificación dentro de los estudios podría ser por géneros, duración del seguimiento (≥ 10 años y < 10 años), localizaciones geográficas de las poblaciones, tipo de evaluación dietética, entre otros. En nuestro caso no se lleva a cabo el análisis de subgrupo, debido al bajo número de estudios (menos de 10) implicados en el meta-análisis.

5.2.7 *Estadística*

Se emplean dos paquetes estadísticos. Uno de ellos es el software Rev. Man 5, elaborado por la Colaboración Cochrane. El otro paquete es el Epidat, desarrollado por el Servicio de Epidemiología de la Xunta de Galicia, con el apoyo de la Organización Panamericana de la Salud (OPS-OMS).

5.3 Resultados y Discusión

5.3.1 Selección de los estudios

De acuerdo con las condiciones de elegibilidad y los criterios de exclusión expuestos en la sección “Metodología”, se llevó a cabo la selección de los estudios para el meta-análisis, canalizándolo a través de un diagrama de flujo.

Definidas las fuentes de información y los términos de búsqueda, o palabras-clave, tal como se detalla en “Metodología”, se emprendió la estrategia de búsqueda electrónica completa. Se recogen las citas bibliográficas para autores, título y resumen, en las primeras fases, y más adelante el artículo completo, si está redactado en inglés, español, francés, o italiano. Se confecciona el diagrama de flujo (Figura 11).

Se emplearon los mismos términos de búsqueda en el manejo de todas las bases de datos exploradas. A partir de la búsqueda se acumulan un gran número de registros bibliográficos. Se revisa para ver si existen duplicaciones. Una vez eliminados éstos, se repasan las citas para títulos y resúmenes, para ver cuáles son potencialmente elegibles. Se realizan eliminaciones secuenciales. Llegado el momento, para seguir excluyendo, hay que repasar el texto completo del artículo. En cuanto al tipo de comunicaciones (artículos de investigación, comunicaciones breves, procedimientos de congresos o reuniones científicas) se optó por los artículos de investigación. Se evitaron datos troceados de diferentes publicaciones sobre el mismo estudio.

Se obtuvieron un total de 372 entradas bibliográficas, de las cuales 38 fueron duplicados (Figura 11). Eliminados los duplicados, restaron 334 citas, que se evaluaron, aplicando los criterios de exclusión y elegibilidad, excluyendo 312 citas que no cumplían con los requisitos preestablecidos. Restaron 22 citas, de las que 14 fueron estudios de cohorte prospectivos, o ensayos aleatorizados controlados, que se excluyeron. Finalmente, quedan incluidos 8 estudios caso-control para someterlos al meta-análisis.

El hecho de admitir sólo los estudios caso-control, y rechazar los de cohorte prospectivos, se debe a que la pretensión con este meta-análisis es la obtención de resultados con estudios que no exijan un tiempo excesivo, requieran menos participación, y sean menos costosos que los de cohortes.

5.3.2 Características de los estudios

Para cada uno de los 8 estudios seleccionados para el meta-análisis se precisa información sobre:

- número de participantes;
- edad de los participantes;
- años de publicación de los estudios;
- duración del seguimiento;
- países involucrados;
- evaluación del efecto de exposición a la grasa *trans*;
- ajuste de variables de confusión.

En la Tabla 28 se resumen las características principales de los estudios seleccionados. El número total de población participante fue de 22.441 mujeres. La población expuesta a la grasa *trans* fue variable, yendo de los 387 participantes, en el estudio de Takata *et al.*, (2009), a los 7.401 participantes, en el estudio de Hu *et al.*, (2011).

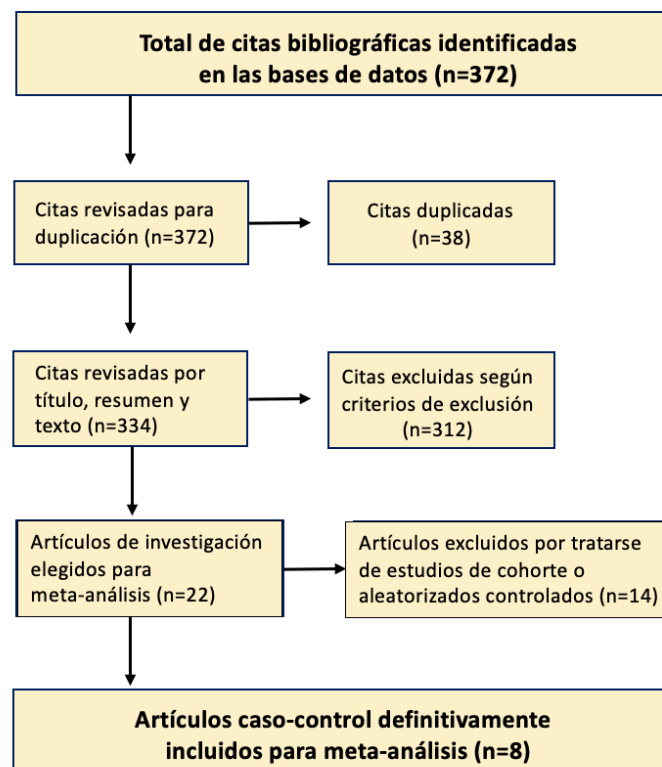


Fig. 11. Diagrama de flujo para la búsqueda bibliográfica.

Tabla 28. Características de los estudios implicados en el meta-análisis.

Estudio	Casos/Controles	Edad (años)	Seguimiento (años)	País	Muestra	OR (90%IC)	Variable ajustada ⁺
Kohlmeier <i>et al.</i> , 1997	209/407	50-74	1990-1992	Zürich Málaga Coleraine Berlín Zeist	Tejido adiposo	1,40 (1,02-1,95)	1, 3, 4, 10, 13
Chajès <i>et al.</i> , 2008	363/702	40-65	1995-2002	Francia	FFQ, sangre	1,45 (0,90-2,34)	1, 2, 3, 5, 7, 8, 9, 10, 17
Wang <i>et al.</i> , 2008	1.703/2.045	35-79	1995-1999	San Francisco (EEUU)	FFQ	1,58 (1,20-2,08)	1, 2, 3, 5, 7, 9, 11, 14, 15, 16, 17
Takata <i>et al.</i> , 2009	130/257	50-69	1985-1994	Irvine, Seattle, Portland (EEUU)	Sangre	1,41 (0,61-3,26)	1, 3, 4, 19
Hu <i>et al.</i> , 2011	2.362/5.039	20-76	1994-1997	Canadá	FFQ	1,60 (1,10-2,33)	1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 13, 18, 19

Estudio	Casos/Controles	Edad (años)	Seguimiento (años)	País	Muestra	OR (90%IC)	Variable ajustada ⁺
Chajès <i>et al.</i> , 2017	2982/2982		1993-2002	Europa (10 países)	Sangre	2,01 (1,03-3,92)	1, 2, 3, 5, 7, 8, 9, 10, 18
Hirko <i>et al.</i> , 2018	794/794	32-54	1996-2007	EEUU	Sangre	1,30 (0,92-1,84)	1, 3, 4, 6, 8, 9, 14, 16, 17, 20
Lope <i>et al.</i> , 2020	795/795	18-70	2006-2011	España	Sangre, FFQ	1,14 (0,86-1,31)	1, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 14, 17

⁺ Ajustado por: Índice de masa corporal¹, altura², ingesta de alcohol³, tabaquismo⁴, nivel educacional⁵, actividad física⁶, número de embarazos⁷, año del primer embarazo⁸, historia familiar de cáncer de mama⁹, uso de terapia hormonal¹⁰, estado menopáusico¹¹, subtipo de cáncer¹², nivel socio-económico¹³, año de menarquía¹⁴, etnia¹⁵, lactancia materna¹⁶, historia de enfermedad benigna de mama¹⁷, ingesta energética¹⁸, centro de estudios¹⁹, uso habitual de AINES²⁰.

La edad de los participantes oscilaba entre los 18 y los 79 años. La duración del seguimiento variaba entre los 2 y los 14 años. Solamente el estudio estadounidense de Hirko *et al.* (2018) superaba los 10 años de seguimiento. Los ocho estudios presentan publicación reciente, entre 1997 y 2020, y corresponden a seguimientos poblacionales entre 1985 y 2011.

Las ingestas de grasa *trans* se medían mediante cuestionarios de frecuencias de consumo de alimentos (cuestionario FFQ), o a través de los bio-marcadores en tejido adiposo o en sangre. Algunos cuestionarios se aplicaron bianualmente a través del seguimiento del estudio. Los estudios fueron realizados en Estados Unidos, Canadá y varios países europeos, incluido España. En cada estudio se llevaron a cabo ajustes para las variables de confusión, como se indica en la Tabla 28. De todos estos factores de confusión los de mayor incidencia fueron: índice de masa corporal (IMC), alcohol-tabaco, nivel educativo, estado menopáusico, historia familiar de enfermedad benigna, e historia familiar de cáncer de mama. La patología se confirmaba por autoinforme, registros médicos, registros hospitalarios.

En los estudios no discriminaban entre población urbana y población rural. Sólo algunos de los estudios emplearon el ensayo ciego, o fases de adaptación. Ninguno de los estudios tuvo fases de seguimiento inferior a 6 meses, el de menor seguimiento fue de 2 años (Kohlmeier *et al.*, 1997).

Además de las características más relevantes de cada estudio, que se resumen en la Tabla 28 completamos con la información sobre otras características:

- Kohlmeier *et al.*, 1997

Se trata de mujeres post-menopáusicas (50-74 años). Participaron 5 ciudades europeas entre ellas una española, Málaga. El estudio se llevó a cabo en centros hospitalarios, y fue de baja duración (2 años). Para la toma muestral se empleó tejido adiposo (biopsia de glúteos). Los niveles encontrados de grasa *trans* fueron 1,30 %TFA (casos) y 1,11 %TFA (controles), sobre grasa total. El tamaño (magnitud) del efecto fue OR=1,46, sin ajuste, y OR=1,40, con ajuste para factores de confusión.

- Chajès et al., 2008

Los participantes eran profesoras francesas pertenecientes a una misma mutualidad de salud. Se empleó toma muestral, por extracción sanguínea, y también cuestionario de historia dietética validado. Se determinó por cromatografía de gases la carga de ácidos grasos *trans* en los fosfolípidos séricos. La magnitud del efecto de exposición a la grasa *trans* (OR) se calculó por regresión logística condicional.

- Wang et al., 2008

En este estudio realizado en San Francisco (USA) participaron distintas etnias (blancos, afroamericanos, latinos). Las mujeres con datos olvidados fueron excluidas del estudio, por riesgo de sesgo. Un 10% de los participantes no dieron el consentimiento para la medida normativa del peso y la altura (cálculo del índice de masa corporal, factor de riesgo). Se utilizó el cuestionario de frecuencias (FFQ) “Block Health History and Habits Questionnaire”, con 106 ítems, que se completaba con alimentos usuales de las respectivas etnias, alimentos ricos en fito-estrógenos, desnatados, y grasas para cocinar. Este estudio presenta como novedad que se compararon sub-tipos de cáncer de mama (grado histológico, estatus receptor de estrógenos, estatus receptor de progesterona).

- Takata et al., 2009

La toma muestral es sangre. Se determina por cromatografía de gases, los niveles de ácidos grasos *trans* en los fosfolípidos de las membranas de eritrocitos. La magnitud del efecto (OR) sólo ajusta por índice de masa corporal, alcohol y tabaquismo. Pero no ajusta por otros factores intermediarios de confusión (como actividad física, estado menopáusico, terapia hormonal, año del primer embarazo...). El tabaquismo estaba implicado en el análisis de subgrupos.

- Hu et al., 2011

Participantes con edades muy tempranas (20 años). Uso de los cuestionarios de frecuencias de consumo clásicos de Block y de Willett, adaptando los ítems estadounidenses a los consumos en Canadá. Inclusión de 69 ítems y cuestiones

específicas, como consumo de patatas fritas, bollería y empanadillas. Emplean la base de datos de composición de alimentos “Archivo de Nutrientes de Canadá (Health Canada)”. Amplio ajuste de OR para variables de confusión.

- Chajès et al., 2017

Participantes del estudio EPIC, donde estaban implicados más de medio millón de participantes en 10 países europeos, en los que se incluía España, con un seguimiento de 10 años. Las consecuencias patológicas de la exposición a la grasa *trans* se dictaminaron a través de registros poblacionales, información derivada de compañías y mutualidades de seguros de salud, y autoinformes.

Se determinaron los niveles de ácidos grasos *trans*, acumulados en los fosfolípidos de membranas eritrocitarias mediante cromatografía de gases. Se detectaron subtipos de cáncer de mama, de acuerdo con el estatus de receptor hormonal (estrógeno, progesterona + ó -), y estado menopáusico (pre-, post-), cuando se extrae la sangre.

- Hirko et al., 2018

Se trabajó sobre la base de la segunda cohorte del “Nurses’ Health Study II”. Comenzó en 1989, con seguimiento bianual, a través de 14 estados de Estados Unidos. En 1996 se tomó una sub-cohorte (edades en el rango de 32-54 años), libres de cáncer, donde se realizaron diagnósticos de cáncer de mama antes del 1 de junio de 2007.

Caso-control ciego. Cada caso se igualó con un control, tomando, como base la edad, estado menopáusico, y la etnicidad. Análisis por cromatografía de gases de los ácidos grasos *trans* en fosfolípidos de membranas eritrocitarias. Se distinguen los isómeros *trans*-18:1 y *trans*-18:2.

Buen ajuste de OR para factores de riesgos intermediarios, entre ellos, uso de fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs). En los análisis de sensibilidad se comprobó la posible influencia del ayuno (extracción de sangre) o de enfermedad preclínica.

- Lope et al., 2020

Incluye participantes jóvenes (18 años). Cada participante elegía un control de su entorno (amigo, vecino, compañero de trabajo). Se trata de un estudio multicentro, que se conduce en España (departamentos de oncología en hospitales de nueve Comunidades Autónomas). Se usaba un cuestionario de frecuencia de consumo (FFQ) semicuantitativo, con 117 ítems, similar al Cuestionario Harvard, validado en poblaciones españolas adultas. También se detectaron los niveles de ácidos grasos *trans* en los fosfolípidos de membrana eritrocitaria, empleando la combinación cromatografía de gases-espectrometría de masas. OR estaba bien ajustada para factores de confusión medianos.

Se detectaron subtipos de cáncer de mama, basándose en el estatus de los receptores hormonales. En el análisis de sensibilidad se consideró la influencia sobre la OR, tanto del índice de masa corporal, como las situaciones pre- y post- menopáusicas, al ser tan diversa las edades de los participantes (18-70 años).

5.3.3 Riesgo de sesgo

El gráfico en embudo fue propuesto como una prueba visual sencilla para detectar un posible riesgo de sesgo. En la Figura 12 aparece representado el gráfico en embudo, error estándar vs log OR: cada estudio primario viene representado por un punto, y aparece la nube de puntos. Se observa cómo los puntos se distribuyen simétricamente en torno a la estimación global del efecto, lo que indica ausencia de sesgo de publicación. Esta simetría y ausencia de riesgo de sesgo se da, a pesar de que varios son estudios pequeños, donde podría haber existido la tendencia a publicar sólo los estudios que muestran diferencias.

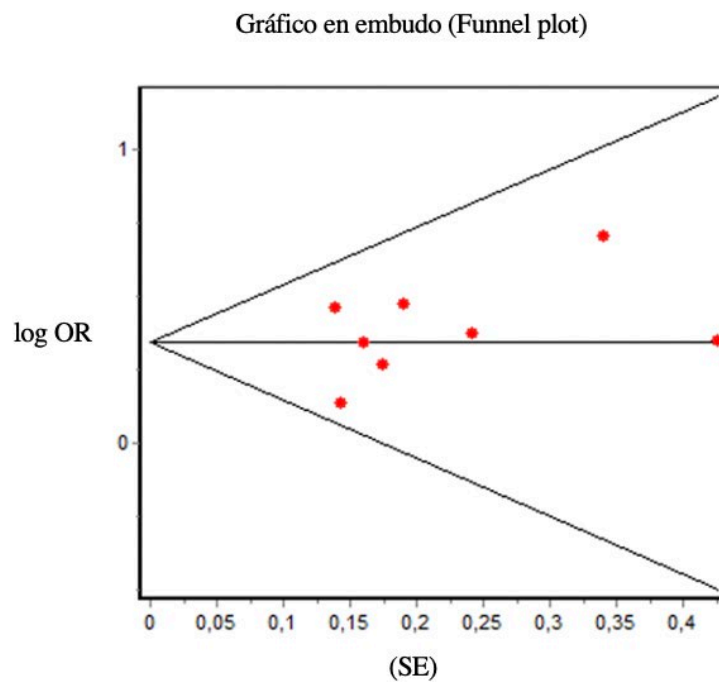


Fig. 12. Gráfico en embudo

Para confirmar los resultados del gráfico en embudo se ha acudido a la prueba de Egger, más específica que la prueba de Begg (que calcula el estadístico Z y el valor p). Consiste en la representación gráfica de la precisión de los estudios (valor inverso del error estándar) (variable independiente) frente al efecto estandarizado (estimación del efecto controlado por error estándar) (variable dependiente), y ajustar la recta de regresión. La prueba de Egger contrasta la hipótesis nula de ausencia de riesgo de publicación. La regresión se pondera por la inversa de la varianza. Está basada en la prueba de significación para el término independiente de la recta ajustada. En la Figura 13 se representa. El valor $P=0,3567$ es mayor que 0,05, y el estadístico que representa el coeficiente de regresión es muy alto (0,9982), agrupándose los estudios a ambos lados de la recta de regresión. Todo esto conforma las deducciones extraídas del gráfico en embudo, de ausencia de sesgo de publicación. Como la recta de regresión no pasa por $Y=0$, sino por $Y=1$, cabe asumir que existe algún estudio que podría introducir algo de sesgo.

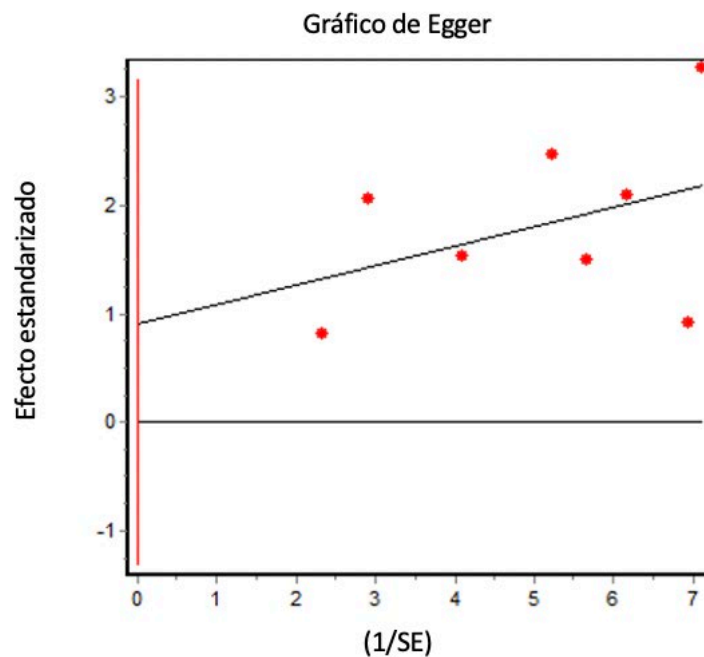


Fig. 13. Gráfico de Egger

En la Tabla 29 se desarrolla la escala NOS (Newcastle-Ottawa Scale) que nos permite una evaluación de la calidad de los estudios comprometidos por ausencias de riesgos de sesgo. Se puede observar que los mayores riesgos de sesgos se centran en:

- Control de estudios por ingesta energética;
- Seguimiento del estudio inferior a 10 años.

El estudio de mayor calidad metodológica es el último de Chajès *et al.*, (2017), con 9 estrellas, seguido con 8 estrellas por los estudios de Takata *et al.*, (2009) y el de Hu *et al.*, (2011), que presenta un control por ingesta energética, mientras que el de Takata *et al.*, (2009) consigue un seguimiento superior (o igual) a 10 años.

Tabla 29. Confección de la Newcastle Ottawa Scale (NOS) para evaluar los riesgos de sesgo en los estudios del meta-análisis.

	Definición adecuada de los casos	Representatividad de los casos	Selección de los controles	Definición de los controles	Control de estudios por ingesta energética	Control de estudios por otros factores	Evaluación de resultado	¿El seguimiento fue lo suficientemente largo (>10 años)?	Seguimiento adecuado de la cohorte (pérdidas < 20%)	Puntuación total
Kohlmeier 1997	*	*	*	*	-	*	*	-	-	6
Chajès 2008	*	*	*	*	-	*	*	-	*	7
Wang 2008	*	*	*	*	-	*	*	-	*	7
Takata 2009	*	*	*	*	-	*	*	*	*	8
Hu 2011	*	*	*	*	*	*	*	-	*	8
Chajès 2017	*	*	*	*	*	*	*	*	*	9

	Definición adecuada de los casos	Representatividad de los casos	Selección de los controles	Definición de los controles	Control de estudios por ingesta energética	Control de estudios por otros factores	Evaluación de resultado	¿El seguimiento fue lo suficientemente largo (>10 años)?	Seguimiento adecuado de la cohorte (pérdidas < 20%)	Puntuación total
Hirko 2018	*	*	*	*	-	*	*	-	*	7
Lope 2020	*	*	*	*	-	*	*	-	*	7

5.3.4 Magnitud del efecto: síntesis cuantitativa

Si la magnitud y dirección del tamaño del efecto son similares es procedente someter a meta-análisis los estudios escogidos. Si se pretende evaluar si los estudios seleccionados se parecen lo suficiente como para intentar combinarlos, se acude al cálculo de la heterogeneidad objetiva, a través del estadístico I^2 . Los estudios primarios deben ser lo suficientemente homogéneos ($I^2 = 0\%$) como para poder “mezclarse” en un análisis de síntesis (meta-análisis).

En la Figura 14 se representa el diagrama de bosque para la síntesis cuantitativa. Como ya era de prever a partir del gráfico en embudo y de la prueba de Egger, existe homogeneidad entre los estudios ($I^2 = 0\%$). Los dos modelos más frecuentemente usados para conducir un meta-análisis son el de efectos fijos y el de efectos aleatorios. Cada uno de ellos maneja la heterogeneidad estadística diferentemente (Sutton & Higgins, 2008). La comprensión de los supuestos de cada modelo nos hará ver cuándo un modelo es más apropiado que otro.

En el modelo de efectos fijos se cumple que entre una serie fijada de estudios existe un efecto de tratamiento común, y que la diferencia en los resultados entre dos estudios

se deberá al azar (Deeks *et al.*, 2001). En el caso de nuestro meta-análisis, donde los estudios muestran una gran homogeneidad ($I^2 = 0\%$), se adoptó el modelo de efectos fijos.

La magnitud globalizada del efecto de exposición a las ingestas de grasa *trans* se aborda a través del diagrama de bosque (Figura 14). La conclusión a la que se llega es que las ingestas de grasas *trans* poblacionales aumentaban en un 41% (OR=1,41) el riesgo de incidencia de cáncer de mama. El peso de cada estudio en el resultado globalizado aumentaba conforme lo hace la precisión del estudio ponderado. En dicha ponderación destacan los estudios de Wang *et al.*, (2008) y de Lope *et al.*, (2020). Como se observa en el diagrama de bosque, la mayoría de los efectos de exposición se posicionan a un solo lado de la línea de referencia que pasa por OR=1, lo que de nuevo confirma la homogeneidad de los estudios. Esto otorga una mayor robustez a la incidencia asociativa grasa *trans*-cáncer de mama.

Hay que tener en cuenta cierto grado de globalización en los estudios analizados. Así, existe cierta versatilidad en las edades (hay mujeres muy jóvenes, 18 años, o excesivamente mayores, 79 años), y en la diversidad geográfica. El valor más alto de la magnitud del efecto aparece en el estudio de Chajès *et al.*, (2017), con un OR=2,01 (1,03-3,92). Dicho estudio se llevó a cabo en 10 países europeos, entre 1993 y 2002. En estas fechas, algunos países participantes, como Dinamarca y Países Bajos, presentaban grandes consumos de margarina, o alimentos procesados con ellos, incluso para la grasa de cocina, y sucedía que aún no estaban en vigor las medidas legislativas restrictivas, que entraron en 2004.

El estudio de Wang *et al.*, (2008), que duró 5 años, estuvo localizado en San Francisco (Estados Unidos), y es el que ofrece un mayor peso (22,3%), respecto al resultado global, mostrando la mayor precisión. Esto se debe, en gran parte, a que es el estudio que ajusta la OR para el mayor número de variables de confusión; algunos de ellos tan importantes como el estado menopáusico, el tratamiento hormonal, la etnia, o si existía previamente historia familiar benigna de mama.

El estudio de Takata *et al.*, (2009) de menor peso (2,4%), y el menos preciso, coincide con la menor participación (menos de 1000 mujeres, entre casos y controles), además, es el que ajusta para un menor número de variables de confusión.

Los valores OR (95 %IC) se sitúan, para todos los estudios, en la zona derecha del diagrama (Figura 14), para valores OR (95 %IC) entre 1 y 6-7, aproximadamente. Esto quiere indicar que en todos los estudios existía un porcentaje más o menos estimable de

riesgo de cáncer de mama. Existe significación en el análisis multivariante, como se deduce del diagrama de bosque, pues la línea perpendicular que pasaría por el cero de la escala no atraviesa el rombo (localización del OR combinado).

Estudio	Casos	Control	OR (95 %IC)	Log OR	SE	Peso (%)
Kohlmeier et al., 1997	209	407	1,40 (1,02-1,92)	0,3365	0,1616	16,8
Wang et al., 2008	1703	2045	1,58 (1,20- 2,08)	0,4574	0,1404	22,3
Chajès et al., 2008	363	702	1,45 (0,90-2,34)	0,3716	0,2433	7,4
Takata et al., 2009	130	257	1,41 (0,61-3,26)	0,3436	0,4275	2,4
Hu et al., 2011	2362	5039	1,60 (1,10-2,33)	0,4700	0,1912	12,0
Chajès et al., 2017	2982	2982	2,01 (1,03-3,92)	0,6981	0,3411	3,8
Hirko et al., 2018	794	794	1,30 (0,92-1,84)	0,2624	0,1764	14,1
Lope et al., 2020	795	795	1,14 (0,86-1,51)	0,1310	0,1438	21,2
Total (95 %IC)	9759	12682	1,41 (1,24-1,60)			100,0

Heterogeneidad: $\text{Chi}^2 = 4,59$; $\text{g.l.} = 7$ ($P=0,71$); $I^2 = 0\%$

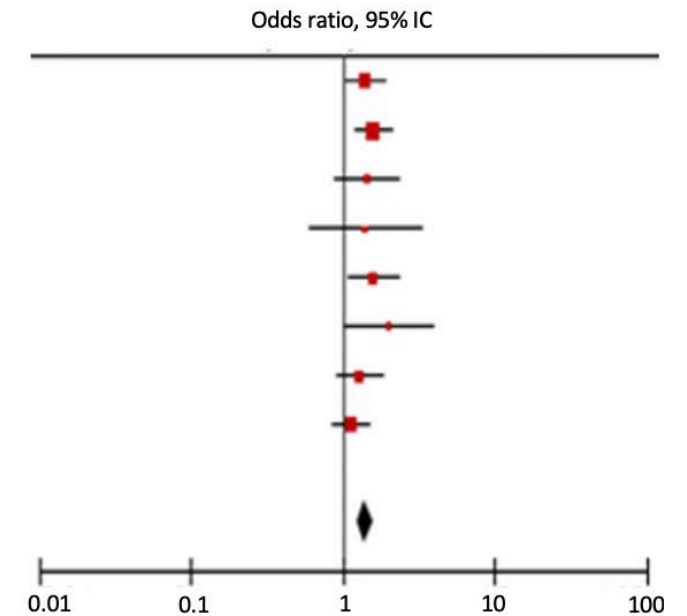


Fig. 14. Datos calculados para el diagrama de bosque.

Gráfico de Galbraith

Un método gráfico muy utilizado para descartar la heterogeneidad es el gráfico de Galbraith (1998) (Figura 15). Se representa la precisión de cada estudio frente a su tamaño de efecto estandarizado, juntamente con la línea de regresión ajustada y una banda de confianza. Es aplicable a cualquier tipo de estudio (observacional, experimental).

La posición de cada estudio respecto al eje de la precisión (abscisas) indica el peso de su contribución al resultado global. La localización del punto del estudio fuera de la banda de confianza indicaría su contribución a la heterogeneidad. La inspección visual del gráfico de Galbraith conduce a las siguientes conclusiones:

- en general, se muestra evidencia de homogeneidad entre los estudios, apartándose un poco del efecto estandarizado general el estudio de Lope *et al.*, (2020). Dicho estudio, con una participación intermedia, inferior a 1.000 mujeres, es el que proporciona la menor estimación del efecto estandarizado, siendo el más preciso, junto al de Wang *et al.*, (2008);
- todos los estudios caen dentro de la banda de confianza del gráfico;
- todos los estudios, excepto el de Lope *et al.*, (2020), se orientan y agrupan por encima de la línea control de la banda de confianza, lo que da idea de la homogeneidad interna entre los estudios.

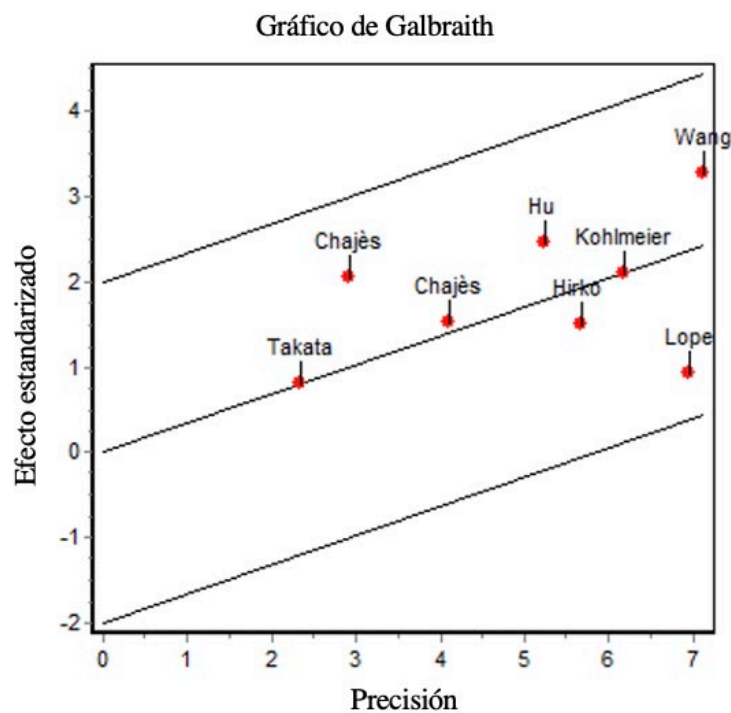


Fig. 15. Gráfico de Galbraith.

5.3.5 Análisis de sensibilidad

Se procedió a omitir un estudio cada vez (con lo que quedarían 7 estudios) y se construía el meta-análisis de nuevo con estos 7 estudios. Entonces se compara si ha variado mucho la magnitud del efecto (OR).

Los resultados aparecen reflejados en la Tabla 30. Se comprueba que sólo en el caso del estudio de Lope *et al.*, (2020) el estadístico OR varió más de un 10%, se pasó de OR=1,41 a OR=1,49. Una explicación podría fundamentarse en el hecho de que el estudio citado acoge participantes muy jóvenes, o excesivamente mayores, donde la incidencia de cáncer de mama sería menos probable. Otra circunstancia sería que el estudio se llevó a cabo en España, donde, al igual que en otros países mediterráneos (Portugal, Italia, Grecia) las ingestas poblacionales registradas de grasa *trans* se sitúan, junto a Japón, entre las más bajas a nivel mundial.

Si aplicamos el procedimiento “dejar uno fuera” a los siete estudios restantes, uno por uno, los valores obtenidos en el meta-análisis respectivo para la magnitud del efecto van de un OR=1,36 a un OR=1,43 (Tabla 30). Es decir, se desvían menos del 10% del valor globalizado que se obtuvo en el meta-análisis de los ocho estudios (OR=1,41). Por lo tanto, el análisis de sensibilidad no intuye variación significativa o diferencial en cuanto a la magnitud del efecto para estos siete estudios considerados globalmente.

Tabla 30. Análisis de sensibilidad.

Estudio omitido	Población	OR	95 %IC	Chi cuadrado	P
Kohlmeier <i>et al.</i> , (1997)	21.743	1,41	1,22-1,62	4,58	0,60
Wang <i>et al.</i> , (2008)	18.693	1,36	1,18-1,58	3,71	0,72
Chajès <i>et al.</i> , (2008)	21.376	1,40	1,23-1,61	4,57	0,60
Takata <i>et al.</i> , (2009)	22.054	1,41	1,23-1,61	4,59	0,60
Hu <i>et al.</i> , (2011)	15.040	1,38	1,20-1,59	4,08	0,67
Chajès <i>et al.</i> , (2017)	16.477	1,39	1,22-1,58	3,45	0,75
Hirko <i>et al.</i> , (2018)	20.153	1,43	1,24-1,64	4,35	0,53
Lope <i>et al.</i> , (2020)	20.851	1,49	1,29-1,72	1,86	0,93

5.3.6 Fortalezas, limitaciones y conclusiones

La mayoría de los estudios se han centrado en mujeres post-menopáusicas. Se realiza ajuste por estado menopáusico en cuatro de los ocho estudios. La edad y las reestructuraciones hormonales parecen favorecer la instalación del cáncer de mama en el estado post-menopáusico (Sczaniecka *et al.*, 2012)

Los estudios de Hu *et al.*, (2011) y de Hirko *et al.* (2018) demostraban la asociación entre las ingestas de grasa *trans* y el riesgo de cáncer de mama (OR igual a 1,60 y 1,30, respectivamente (Figura 14) en mujeres pre-menopáusicas. En el primer estudio se apreciaba la influencia del consumo de alcohol y tabaco y si los participantes no tenían estudios superiores. Aunque se ajustaba para la relación lineal, se empleó un cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos, más expuesto al riesgo de sesgo que el uso de bio-marcadores (sangre, tejido adiposo); el cuestionario podría venir acompañado de un sesgo de memoria de la participante a la hora de recordar tipo de alimento, raciones y frecuencias.

En el estudio de Hirko *et al.*, (2018) muchas de las participantes presentaban sobrepeso u obesidad, que podía considerarse como enfermedad inflamatoria crónica y constituye un importante factor de confusión (índice de masa corporal).

Fortalezas

Mientras más pequeño sea el error estándar mayor es la fortaleza de la evidencia (“strength of evidence, SOE”). En este sentido, la fortaleza es mayor en los estudios de Lope *et al.*, (2020) y de Wang *et al.* (2008), mientras que la fortaleza más baja correspondería al estudio de Takata *et al.*, (2009).

Una de las principales fortalezas del presente meta-análisis es que se incluye a muchos países, ciudades y localizaciones de Europa y Norteamérica (Estados Unidos y Canadá).

Otra fortaleza es que la mayoría de los estudios se realizan sobre muestras de sangre (eritrocitos, suero), lo que supone un menor riesgo de sesgo, frente al empleo de otras estrategias, como registro de alimentación de 3 ó 7 días, recuerdo de 24 horas, historia clínica.

Una tercera fortaleza es la inclusión en el meta-análisis, por primera vez, de un estudio donde se analizó cómo influye la presencia de los ácidos grasos *trans* en los diferentes subtipos de cáncer de mama.

Una cuarta fortaleza es que todos los estudios de investigación considerados, menos uno, pertenecen al presente siglo, lo que permite considerar los últimos avances en esta tarea investigadora, así como el uso de población multiétnica.

Limitaciones

Aunque todos los estudios superaron el umbral mínimo de los 6 meses de seguimiento, solamente dos estudios procuraron un seguimiento de 10 años.

En los estudios no hay menciones específicas a los ácidos vacénico (*trans*-18:1) o ruménico (*trans*-18:2) y, en cualquier caso, el ácido elaídico es el isómero *trans* predominante.

Un aspecto importante que habría que tener en cuenta, fundamentalmente en los estudios con seguimiento más prolongados, es la toma de muestra de sangre, o la biopsia de tejido adiposo más de una vez en el tiempo, debido a que, como consecuencia de las reformulaciones (fraccionamiento, interesterificación) podrían descender los contenidos de grasa *trans* en los alimentos procesados.

Las variables de confusión no son las mismas en todos los estudios. Serán más robustas aquellos estudios que se ajusten correctamente para un mayor número de variables de confusión, teniendo en cuenta no sólo las más evidentes, también las intermedias.

El número de participantes difiere de un estudio a otro. En ese sentido hay que detectar el estudio de Chajès *et al.*, (2017) con más de 1.000 participantes (incluye cerca de 3.000 participantes).

Una limitación podría ser el bajo número de estudios incluidos definitivamente en el meta-análisis. Eso se compensa con la especificidad de los estudios escogidos (caso-control), la buena adecuación de las poblaciones control y la incontestable homogeneidad entre los estudios, mostrada por la magnitud del efecto de exposición a las ingestas de grasas *trans* (OR). En el estudio de Lope *et al.*, (2020), que elige como población control a vecinos y amigos, cabría esgrimir cierta proporción de riesgo selectivo, por lo que supondría una mayor similitud en los estilos de vida en la población control.

Debido a que los estudios seleccionados son menos de diez no se ha podido llevar a cabo análisis de subgrupos (pre-menopáusicas *vs* post-menopáusicas; obesas *vs* no obesas, por niveles educativos; por lactancia materna, etc.) para evaluar qué subgrupos podrían presentar mayor riesgo de cáncer de mama.

5.4 Conclusiones

Aunque el número de estudios caso-control finalmente seleccionados para el meta-análisis puede parecer pequeño para extraer conclusiones más firmes, no deja de ser evidente que en estos estudios llevados a cabo entre 1985 y 2020 se constata hasta un 41% de riesgo de incidencia de cáncer de mama debido a las ingestas de grasa *trans*, tanto en Europa como en América después del análisis combinativo; máxime si seis de los ocho estudios se desarrollaron antes de la limitación al 2% TFA, sobre grasa total, introducida por Dinamarca.

El estudio más reciente es el de Lope *et al.* (2020), que tuvo un seguimiento de seis años (2006-2011), es posterior a la legislación danesa de 2004, y previo a la descalificación como sustancia GRAS de los aceites parcialmente hidrogenados (FDA).

Es evidente que existen otros diseños adecuados para este tipo de estudios además del caso-control, como los de cohorte prospectivos, y los ensayos aleatorizados controlados, estos últimos más complejos y caros. Futuras investigaciones podrían abordar el meta-análisis para estas estrategias, para intentar reforzar las evidencias extraídas en el presente meta-análisis de casos – controles.

Algunos de los ocho estudios considerados abordan la incidencia de la grasa *trans* sobre los distintos tipos de cáncer de mama, en función de su receptor hormonal, lo cual puede ser importante a la hora del diagnóstico de la enfermedad.

Puesto que en los ocho estudios seleccionados se han utilizado una serie de metodologías (FFQ, tejido adiposo, bio-marcadores sanguíneos) para evaluar las ingestas promedios de grasa *trans* de las participantes, en el momento de comparar los estudios habría que tener en cuenta que introducen riesgos de sesgo diferenciados.

En general, en todos los estudios se han llevado a cabo buenos ajustes para el efecto de tratamiento, teniendo en consideración las variables de confusión. En los estudios más ajustados, donde están presentes más variables intermedias, podría darse una subestimación de la magnitud del efecto de exposición a grasa *trans*.

CONCLUSIONES FINALES

Conclusiones finales

Determinación, factores de formación e ingestas de grasa trans en la dieta española por aplicación de la espectroscopia infrarroja de segunda derivada ATR-FTIR (2D)

1. La diversidad de efectos negativos de los ácidos grasos *trans*, abordados en áreas que van desde las enfermedades cardiovasculares hasta enfermedades metabólicas, como diabetes tipo-2, sugiere que la limitación de su ingesta no solo es relevante para la salud individual, sino que también tiene implicaciones importantes para la salud pública en general. La conexión de los ácidos grasos *trans* con distintas enfermedades resalta la necesidad de estrategias de salud pública para reducir el consumo de los mismos.
2. La aplicación de la espectroscopía de absorción infrarroja, en particular el método ATR-FTIR, se destaca como una herramienta práctica y legislativa eficiente para cuantificar enlaces *trans* aislados en grasas. Comparado con la cromatografía de gases, el ATR-FTIR es más simple, rápido y económico, proporcionando resultados precisos para el control legislativo y de procesos en la determinación de ácidos grasos *trans*. La evolución de la técnica, desde medidas dispersivas hasta la validación de métodos de segunda derivada, ha mejorado significativamente la exactitud y la selectividad del análisis.
3. La contradicción entre las ventajas técnicas de los aceites parcialmente hidrogenados (estabilidad, funcionalidad, bajo costo) y sus desventajas nutricionales (altos niveles de ácidos grasos saturados y la formación de ácidos grasos *trans*) destaca un dilema en la industria alimentaria. Esto ha conducido a la necesidad de encontrar soluciones alternativas que satisfagan tanto las necesidades técnicas como las nutricionales, y destaca la importancia de la responsabilidad social de las empresas alimentarias en la producción de alimentos saludables.
4. La implementación de medidas legislativas, como etiquetado obligatorio, reformulación de alimentos y prohibiciones, ha logrado reducir significativamente los niveles de ácidos grasos *trans* en productos alimentarios y su ingesta global. El análisis de estudios muestra descensos en los contenidos de grasa *trans* y en la suma de ácidos grasos saturados y *trans*. Aunque la prevalencia de productos "libres de grasa *trans*" es más alta con prohibiciones, incluso en situaciones de auto-regulación voluntaria se

Conclusiones finales

Determinación, factores de formación e ingestas de grasa trans en la dieta española por aplicación de la espectroscopia infrarroja de segunda derivada ATR-FTIR (2D)

observa una disminución. La concienciación del consumidor, respaldada por campañas informativas y educativas, es crucial para mantener esta tendencia positiva en la reducción del consumo de grasas *trans*.

5. La legislación que prohíbe el uso de aceites parcialmente hidrogenados ha llevado a mejoras sustanciales en la composición grasa de la margarina. La tendencia actual muestra una reformulación exitosa para reducir los ácidos grasos *trans*, transformando la margarina en una alternativa sin colesterol a la mantequilla. Además, la aplicación de tecnologías innovadoras, como la interesterificación enzimática y la exploración de nuevas bases lipídicas, abre posibilidades para desarrollar margarinas más saludables y con propiedades sensoriales apropiadas, allanando el camino hacia opciones alimenticias más seguras y beneficiosas para la salud.
6. Los productos alimentarios analizados en esta Tesis cumplen en su mayoría con las regulaciones de la Comisión Europea sobre los niveles permitidos de grasa *trans* en alimentos. Esto indica un progreso significativo en la mejora de la composición de productos procesados para adaptarse a estándares más estrictos, tanto a nivel nacional como internacional. Sin embargo, se destaca la necesidad continua de monitoreo, colaboración entre la industria alimentaria y las instituciones gubernamentales, y medidas reguladoras para garantizar la sostenibilidad de estos logros y promover la salud cardiovascular de la población.
7. A pesar de los avances, se subraya la importancia de mantener la vigilancia debido a posibles variabilidades y ocultamientos en la información. Se sugiere la posibilidad de legislar la declaración obligatoria de la cantidad exacta de ácidos grasos *trans* en el etiquetado nutricional para proporcionar información más precisa a los consumidores. Esto podría contribuir a una mayor conciencia y elección más informada por parte de los consumidores.

Conclusiones finales

Determinación, factores de formación e ingestas de grasa trans en la dieta española por aplicación de la espectroscopia infrarroja de segunda derivada ATR-FTIR (2D)

8. La discusión detallada sobre parámetros específicos, como acidez, índice de peróxidos, índice de refracción y extinciones UV, subraya la importancia crítica del control de calidad en la producción de aceite de oliva. La identificación de correlaciones entre estos parámetros proporciona una visión integral de la calidad de los aceites vegetales. Permite comprender mejor cómo ciertos aspectos, como la acidez, pueden estar relacionados con la formación de ácidos grasos *trans* o la calidad general del aceite. Estas correlaciones pueden servir como herramientas efectivas para los productores y reguladores en la evaluación y mejora continua de los procesos de producción de aceite de oliva.

9. Aunque el número de estudios caso-control seleccionados para el meta-análisis pueda parecer limitado para sacar conclusiones definitivas, los resultados apuntan a un aumento en el riesgo de desarrollar cáncer de mama relacionado con la ingesta de grasa *trans* de hasta un 41%. Algunos de los estudios consideran la incidencia de la grasa *trans* en diferentes tipos de cáncer de mama según su receptor hormonal, lo cual podría ser relevante para el diagnóstico de la enfermedad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aase S (2009). Taking trans fats of the menu: What you can learn from trans-fat ban at Sheikh Khalifa Medical City and the Cleveland Clinic. *J Am Diet Assoc*, 109, 1148-1151.

Abbey, M., & Nestel, P. J.(1994). Plasma cholesteryl ester transfer protein activity is increased when trans-elaidic acid is substituted for cis-oleic acid in the diet. *Atheroscler*, 106(1), 99-107. [https://doi.org/10.1016/0021-9150\(94\)90086-8](https://doi.org/10.1016/0021-9150(94)90086-8).

Abramovič, H., Vidrih, R., Zlatič, E., Kokalj, D., Schreiner, M., Žmitek, K., Kušar, A., & Pravst, I. (2018). Trans fatty acids in margarines and shortenings in the food supply in Slovenia. *J Food Compost Anal*, 74, 53-61. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2018.08.007>.

Adam, M., Mossoba, M.M., & Lee, T (2000). Rapid determination of total trans fat content by attenuated total reflection infrared spectroscopy: An international collaborative study. *J Am Oil Chem Soc*, 77, 457-462.

Adeleke, B. S., & Babalola, O. O. (2020). Oilseed crop sunflower (*Helianthus annuus*) as a source of food: Nutritional and health benefits. *Food Sci Nutr*, 8(9), 4666-4684. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1783>.

AESAN (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición). (2010). Informe del Comité Científico de la AESAN sobre el riesgo asociado a la presencia de ácidos grasos trans en alimentos. *Rev Com Cient. AESAN*, 12, 95-114.

Albers, M. J., Harnack, L. J., Steffen, L. M., & Jacobs, D. R. (2008). 2006 Marketplace Survey of Trans-Fatty Acid Content of Margarines and Butters, Cookies and Snack Cakes, and Savory Snacks. *J Am Diet Assoc*, 108(2), 367-370. <https://doi.org/10.1016/j.jada.2007.10.045>.

Albuquerque, T. G., Santos, J., Silva, M. A., Oliveira, M. Beatriz. P. P., & Costa, H. S. (2018). An update on processed foods: Relationship between salt, saturated and trans fatty acids contents. *Food Chem*, 267, 75-82. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.029>.

Albuquerque G, Sousa S, de Morans IE, Gelormini M, Santos, Moreira P *et al.* (2022). What is

the sodium and trans fat content in popular street and takeaway food in Bosnia and Herzegovina? *J Food Comp Anal*, 114.

Allen RR (1960). Hydrogenation. *J Am Oil Chem Soc*, 37, 521-523.

Allen, R. R., & Kiess, A. A. (1955). Isomerization during hydrogenation. I. Oleic acid. *J Am Oil Chem Soc*, 32(7), 400-405. <https://doi.org/10.1007/BF02639696>.

Allen, K., Pearson-Stuttard, J., Hooton, W., Diggle, P., Capewell, S., & O'Flaherty, M. (2015). Potential of trans fats policies to reduce socioeconomic inequalities in mortality from coronary heart disease in England: Cost effectiveness modelling study. *BMJ*, h4583. <https://doi.org/10.1136/bmj.h4583>.

Almendingen, K., Jordal, O., Kierulf, P., Sandstad, B., & Pedersen, J. I. (1995). Effects of partially hydrogenated fish oil, partially hydrogenated soybean oil, and butter on serum lipoproteins and Lp[a] in men. *J Lipid Res*, 36(6), 1370–1384.

Alonso, L., Fraga, M. J., & Juárez, M. (2000). Determination of *trans* fatty acids and fatty acid profiles in margarines marketed in Spain. *J Am Oil Chem Soc*, 77(2), 131-136. <https://doi.org/10.1007/s11746-000-0022-8>.

Alvarruiz, A., Pardo, J. E., Copete, M. E., Miguel, C. de, Rabadán, A., López, E., & Álvarez-Ortí, M. (2020). Evolution of Virgin Olive Oil during Long-term Storage. *J. Oleo Sci*, 69(8), 809-814. <https://doi.org/10.5650/jos.ess19258>.

Amrutha Kala, A. L. (2012). *Cis* -, *trans* - and Saturated Fatty Acids in Selected Hydrogenated and Refined Vegetable Oils in the Indian Market. *J Am Oil Chem Soc*, 89(10), 1813-1821. <https://doi.org/10.1007/s11746-012-2086-y>.

Anderson, N. K., Beerman, K. A., McGuire, M. A., Dasgupta, N., Griinari, J. M., Williams, J., & McGuire, M. K. (2005). Dietary Fat Type Influences Total Milk Fat Content in Lean Women. *J Nutr*, 135(3), 416-421. <https://doi.org/10.1093/jn/135.3.416>.

Angell, S. Y. (2009). Cholesterol Control Beyond the Clinic: New York City's Trans Fat Restriction. *Ann Intern Med*, 151(2), 129. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-151-2-200907210-00010>.

Ansorena, D., Echarte, A., Ollé, R., & Astiasarán, I. (2013). 2012: No trans fatty acids in Spanish bakery products. *Food Chem*, 138(1), 422-429. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.10.096>.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). (2003). Resolução RDC no. 360 de dezembro de 2003. Dispõe regulamento técnico sobre rotulagem nutricional de alimentos embalados. Diário oficial de República Federativa do Brasil, 23 dezembro. Brasília: Poder Executivo.

AOAC (2006). AOAC Method 996.06. Fat (total, saturated, and unsaturated) in foods. Hydrolytic extraction. *Official Methods of Analysis* 18th ed. Gaithersburg, MD.

AOCS (2009). Official Method Cd 14e-09: Negative second derivative infrared spectroscopic method for the rapid (5 min) determination of total isolated trans fat. *AOCS Press Champaign IL*.

Arab, L. (2003). Biomarkers of Fat and Fatty Acid Intake. *J Nutr*, 133(3), 925S-932S. <https://doi.org/10.1093/jn/133.3.925S>.

Aro, A. (2006). The scientific basis for trans fatty acid regulations—Is it sufficient? *Atheroscler Suppl*. 7(2), 67-68. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2006.04.015>.

Aro, A., Salminen, I., Huttunen, J. K., Kardinaal, A. F. M., van't Veer, P., Kark, J. D., Riemersma, R. A., Delgado-Rodriguez, M., Gomez-Aracena, J., Kohlmeier, L., Thamm, M., Martin, B. C., Martin-Moreno, J. M., Mazaev, V. P., Ringstad, J., & Kok, F. J. (1995). Adipose tissue isomeric trans fatty acids and risk of myocardial infarction in nine countries: The EURAMIC study. *The Lancet*, 345(8945), 273-278. <https://doi.org/10.1016/S0140->

6736(95)90273-2.

Aronis, K. N., Khan, S. M., & Mantzoros, C. S. (2012). Effects of trans fatty acids on glucose homeostasis: A meta-analysis of randomized, placebo-controlled clinical trials. *Am J Clin Nutr*, 96(5), 1093-1099. <https://doi.org/10.3945/ajcn.112.040576>.

Ascherio, A. (2006). Trans fatty acids and blood lipids. *Atheroscler Suppl*, 7(2), 25-27. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosissup.2006.04.018>.

Ascherio, A., Katan, M. B., Zock, P. L., Stampfer, M. J., & Willett, W. C. (1999). Trans Fatty Acids and Coronary Heart Disease. *N Engl J Med*, 340(25), 1994-1998. <https://doi.org/10.1056/NEJM199906243402511>.

Assaf, R. R. (2014). Overview of Local, State, and National Government Legislation Restricting Trans Fats. *Clin Th* 36(3), 328-332. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2014.01.005>.

Astiasarán, I., Abella, E., Gatta, G., & Ansorena, D. (2017). Margarines and Fast-Food French Fries: Low Content of trans Fatty Acids. *Nutrients*, 9(7), 662. <https://doi.org/10.3390/nu9070662>.

Astrup, A. (2006). The trans fatty acid story in Denmark. *Atheroscler Suppl*, 7(2), 43-46. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosissup.2006.04.010>.

Aued-Pimentel, S., & Kus-Yamashita, M. M. (2021). Analysis of the fat profile of industrialized food in Brazil with emphasis on trans-fatty acids. *J Food Compost Anal*, 97, 103799. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103799>.

Bada Gancedo, J. C., Prieto González, M. M., Xiberta Bernat, J., Graciani Constante, E., & León Camacho, M. (2002). Application of two heating methods in physical refining of high-FA olive and sunflower oils. *J Am Oil Chem Soc*, 79(3), 209-214. <https://doi.org/10.1007/s11746-002-0462-1>.

Barnard, N. D., Bunner, A. E., & Agarwal, U. (2014). Saturated and trans fats and dementia: A systematic review. *Neurobiol Aging*, 35, S65-S73. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.02.030>.

Barrado, E., Mayo, M., Tesedo, A., Romero, H., & Rosa, F. (2008). Composición grasa de diversos alimentos servidos en establecimientos de «comida rápida». *Nutr Hosp*, 23(2), 148-158.

Barros, B. V. D., Proença, R. P. D. C., Kliemann, N., Hilleshein, D., Souza, A. A. D., Cembranel, F., Bernardo, G. L., Uggioni, P. L., & Fernandes, A. C. (2022). Trans-Fat Labeling in Packaged Foods Sold in Brazil Before and After Changes in Regulatory Criteria for Trans-Fat-Free Claims on Food Labels. *Front Nutr*, 9, 868341. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.868341>.

Bauman, D. E., & Lock, A. L. (2006). Conjugated Linoleic Acid: Biosynthesis and Nutritional Significance. En P. F. Fox & P. L. H. McSweeney (Eds.), *Advanced Dairy Chemistry Volume 2 Lipids* (pp. 93-136). Springer US. https://doi.org/10.1007/0-387-28813-9_3.

Beare-Rogers, J. L. (1983). Trans- and positional isomers of common fatty acids. *Adv. Nutr. Res.*, 5, 171-200. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-9937-7_8.

Belton, P.S., Wilson, R.H., Sadeghi-Jorabchi, H., & Peers, K.E. (1988). A rapid method for the estimation of isolated trans double bonds in oils and fats using Fourier transform infrared spectroscopy combined with attenuated total reflectance. *LWT*, 21, 153-157.

Bhanger, M. I., & Anwar, F. (2004). Fatty acid (FA) composition and contents of *trans* unsaturated FA in hydrogenated vegetable oils and blended fats from Pakistan. *J Am Oil Chem Soc*, 81(2), 129-134. <https://doi.org/10.1007/s11746-004-0870-2>.

Boatella, J., Rafecas, M., Codony, R., Gibert, A., Rivero, M., Tormo, R., Infante, D., & Sánchez-Valverde, F. (1993). Trans Fatty Acid Content of Human Milk in Spain: *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 16(4), 432-434. <https://doi.org/10.1097/00005176-199305000-00015>.

BOE (Boletín Oficial del Estado). (2011). Ley 17/2011, de 5 de julio, de Seguridad Alimentaria y Nutrición. BOE núm. 160, de 6 de julio de 2011; pp-71283-71319.

BOE (Boletín Oficial del Estado). (2019). Reglamento (UE) 2019/649 de la Comisión, de 24 de abril de 2019, que modifica el anexo III del Reglamento (CE) n° 1925/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo que se refiere a las grasas trans, que no sean las grasas trans presentes de forma natural en las grasas de origen animal.

Borra, S., Kris-Etherton, P. M., Dausch, J. G., & Yin-Piazza, S. (2007). An Update of Trans-Fat Reduction in the American Diet. *J Am Diet Assoc*, 107(12), 2048-2050. <https://doi.org/10.1016/j.jada.2007.10.020>.

Bortolotto, J. W., Reis, C., Ferreira, Â., Costa, S., Mottin, C. C., Souto, A. A., & Guaragna, R. M. (2005). Higher Content of Trans Fatty Acids in Abdominal Visceral Fat of Morbidly Obese Individuals undergoing Bariatric Surgery compared to Non-Obese Subjects. *Obes Surg*, 15(9), 1265-1270. <https://doi.org/10.1381/096089205774512375>.

Boué, C., Combe, N., Billeaud, C., Mignerot, C., Entressangles, B., They, G., Geoffrion, H., Brun, J. L., Dallay, D., & Leng, J. J. (2000). Trans fatty acids in adipose tissue of French women in relation to their dietary sources. *Lipids*, 35(5), 561-566. <https://doi.org/10.1007/s11745-000-556-4>.

Brandt, E. J. (2011). Deception of Trans Fats on Food and Drug Administration Food Labels: A Proposed Revision to the Presentation of Trans Fats on Food Labels. *Am J Health Promot*, 25(3), 157-158. <https://doi.org/10.4278/ajhp.100603-CIT-174>.

Braue, E. H., & Pannella, M. G. (1987). Consistency in Circle Cell FT-IR Analysis of Aqueous Solutions. *Appl Spectrosc*, 41(6), 1057-1067. <https://doi.org/10.1366/0003702874447950>.

Breton, I. (2014). Ingesta de grasas *trans*; situación en España. *Nutr. Hosp*, 4, 704-711. <https://doi.org/10.3305/nh.2014.29.4.7337>.

Brouwer, I. A., Wanders, A. J., & Katan, M. B. (2013). Trans fatty acids and cardiovascular health: Research completed? *Eur J Clin Nutr*, 67(5), 541-547. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2013.43>.

Brownell, K. D., & Pomeranz, J. L. (2014). The Trans-Fat Ban—Food Regulation and Long-Term Health. *N Engl J Med*, 370(19), 1773-1775. <https://doi.org/10.1056/NEJMp1314072>.

Brühl L. (1995). Determination of trans fatty acids in cold pressed oils. *Eur J Med Sci*, 1(2), 89–93. (s. f.).

Brühl, L. (1996). Determination of trans fatty acids in cold pressed oils and in dried seeds. *Lipid / Fett*, 98(11), 380-383. <https://doi.org/10.1002/lipi.19960981107>.

Burdaspal PA, Legarda TM, Corrales ML, Delgado P & Marcos V (2010). Análisis de la composición grasa de diversos alimentos comercializados en España. *Rev Com Cientif. AESAN*, 11, 69-80.

Butt MS & Sultan MT (2009). Levels of trans fats in diets consumed in developing economies. *JAOAC Int*, 92(5), 1277-83.

CAE (Código Alimentario Español). *Tecnos*. Madrid, 1997.

Capita R & Alonso-Calleja C (2003). Trans-fatty acids in the Spanish diet. *Agro Food Ind. Hi Tech*, 14(4), 38-41.

Caponio, F., & Gomes, T. (2004). Examination of Lipid Fraction Quality of Margarine. *J Food Sci*, 69(1), FCT63-FCT66. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb17857.x>.

Castro, M. A. de, Barros, R. R., Bueno, M. B., César, C. L. G., & Fisberg, R. M. (2009). Trans fatty acid intake among the population of the city of São Paulo, Brazil. *Rev Saude Publica*, 43(6), 991-997. <https://doi.org/10.1590/S0034-89102009005000084>.

CEE (1991). Reglamento CEE No 2568/91, de 11 de julio de 1991. Características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva, y sobre sus métodos de análisis. *DOCE* L248, 1-83.

CEE (1992). Reglamento CEE No 1429/92, de 26 de mayo de 1992. Modificaciones del Reglamento CEE No. 2568/91. *DOCE* L150, 17-20.

CEE (2003). Reglamento CEE No 1989/2003. Características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis. *DOCE* L295, 57-66.

CEE (2006). Directiva 2006/141/CE de la Comisión Europea, de 22 de diciembre de 2006, relativa a los preparados para lactantes y preparados de continuación, y por la que se modifica la Directiva 1999/21/CE. *DOCE* 240, de 30 de diciembre de 2006.

Chajès, V., Assi, N., Biessy, C., Ferrari, P., Rinaldi, S., Slimani, N., Lenoir, G. M., Baglietto, L., His, M., Boutron-Ruault, M. C., Trichopoulou, A., Lagiou, P., Katsoulis, M., Kaaks, R., Kühn, T., Panico, S., Pala, V., Masala, G., Bueno-de-Mesquita, H. B., ... Romieu, I. (2017). A prospective evaluation of plasma phospholipid fatty acids and breast cancer risk in the EPIC study. *Ann Oncol*, 28(11), 2836-2842. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx482>.

Chajes, V., Thiebaut, A. C. M., Rotival, M., Gauthier, E., Maillard, V., Boutron-Ruault, M.-C., Joulin, V., Lenoir, G. M., & Clavel-Chapelon, F. (2008). Association between Serum trans-Monounsaturated Fatty Acids and Breast Cancer Risk in the E3N-EPIC Study. *Am J Epidemiol*, 167(11), 1312-1320. <https://doi.org/10.1093/aje/kwn069>.

Chalmers, J. M., & Griffiths, P. R. (2001). Vibrational Spectroscopy: Sampling Techniques and Fiber-Optic Probes. *Handbook of Vibrational Spectroscopy* (1.^a ed.). Wiley. <https://doi.org/10.1002/0470027320.s8936>.

Chardigny, J.M., Destailats, F., Malpuech-Brugère, C., Moulin, J., Bauman, D. E., Lock, A. L., Barbano, D. M., Mensink, R. P., Bezelgues, J.-B., Chaumont, P., Combe, N., Cristiani, I., Joffre, F., German, J. B., Dionisi, F., Boirie, Y., & Sébédio, J.-L. (2008). Do trans fatty acids from industrially produced sources and from natural sources have the same effect on

cardiovascular disease risk factors in healthy subjects? Results of the trans Fatty Acids Collaboration (TRANSFACT) study. *Am J Clin Nutr*, 87(3), 558-566. <https://doi.org/10.1093/ajcn/87.3.558>.

Chavarro, J. E., Minguez-Alarcon, L., Mendiola, J., Cutillas-Tolin, A., Lopez-Espin, J. J., & Torres-Cantero, A. M. (2014). Trans fatty acid intake is inversely related to total sperm count in young healthy men. *Hum Reprod*, 29(3), 429-440. <https://doi.org/10.1093/humrep/det464>.

Chavasit, V., Photi, J., Kriengsinyos, W., Ditmetharaj, M., Preecha, S., & Tontisirin, K. (2019). Overcoming the Trans Fat Problem in Thailand. *Curr Dev Nutr*, 3(6), nzz045. <https://doi.org/10.1093/cdn/nzz045>.

Chaves, K. F., Barrera-Arellano, D., & Ribeiro, A. P. B. (2018). Potential application of lipid organogels for food industry. *Food Res Int*, 105, 863-872. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.12.020>.

Chen, Z.-Y., Pelletier, G., Hollywood, R., & Ratnayake, W. M. N. (1995). Trans fatty acid isomers in Canadian human milk. *Lipids*, 30(1), 15-21. <https://doi.org/10.1007/BF02537037>.

Cleverley, Barry. (1960). Determination of Unconjugated Trans Unsaturation in C₁₈ Acids and Esters from Natural Sources. *Anal Chem*, 32(1), 128-130. <https://doi.org/10.1021/ac60157a038>.

Codex Alimentarius Commission (2006). Report of the Twenty-sixth Session. Geneva, CH.

Combe N (2002). Acides gras trans et maladies cardiovasculaires. *Act Med Int. Metabolismes-Hormones-Nutrition* 6 (4), 168-170.

Combe, N., Judde, A., & Boue, C. (1998). Trans fatty acid composition of adipose tissue in a French population and dietary origins of these trans fatty acids. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides (OCL)*, 5(2), 142-148.

Comisión Europea (2013). Trans fatty acids in diets: Health and legislative implications. A

workshop report 9th-10th April 2013, Zagreb, Croatia. Joint Research Centre. Luxembourg.

Comisión Europea (2019). Reglamento (UE) 2019/649 de la Comisión, de 24 de abril de 2019, que modifica el anexo III del Reglamento (CE) n.º 1925/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo que se refiere a las grasas trans, que no sean las grasas trans presentes de forma natural en las grasas de origen animal. *DOCE*, L110/17.

Coombes, R. (2011). Trans fats: Chasing a global ban. *BMJ*, 343, d5567-d5567. <https://doi.org/10.1136/bmj.d5567>.

Costa, N., Cruz, R., Graça, P., Breda, J., & Casal, S. (2016). Trans fatty acids in the Portuguese food market. *Food Control*, 64, 128-134. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.12.010>.

Cowan D, Holm HC (2006). Application of enzymatic interesterification for the manufacture of margarine components free of trans fats. *Lipid Technol*, 18(5), 101-104.

Craig-Schmidt, M. C. (2006). World-wide consumption of trans fatty acids. *Atheroscler Suppl*, 7(2), 1-4. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosissup.2006.04.001>.

De Greyt, W. F., Kellens, M. J., & Huyghebaert, A. D. (1999). Effect of physical refining on selected minor components in vegetable oils. *Lipid/Fett*, 101(11), 428-432. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4133\(199911\)101:11<428::AID-LIPI428>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4133(199911)101:11<428::AID-LIPI428>3.0.CO;2-T).

Deeks, J.J., Altman, D.G. & Bradburn, M.J. (2001). Statistical Methods for Examining Heterogeneity and Combining Results from Several Studies in Meta-Analysis. In *Systematic Reviews in Health Care* (eds M. Egger, G.D. Smith and D.G. Altman). <https://doi.org/10.1002/9780470693926.ch15>.

DerSimonian, R., & Laird, N. (1986). Meta-analysis in clinical trials. *Control Clin Trials*, 7(3), 177-188. [https://doi.org/10.1016/0197-2456\(86\)90046-2](https://doi.org/10.1016/0197-2456(86)90046-2).

Destailats, F., & Angers, P. (2005). Thermally induced formation of conjugated isomers of

linoleic acid. *Eur J Lipid Sci Technol*, 107(3), 167-172. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200401088>.

Dixit, S., & Das, M. (2012). Fatty Acid Composition Including *Trans* -Fatty Acids in Edible Oils and Fats: Probable Intake in Indian Population. *J Food Sci*, 77(10), T188-T199. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02875.x>.

Doell, D., Folmer, D., Lee, H., Honigfort, M., & Carberry, S. (2012). Updated estimate of *trans* fat intake by the US population. *Food Addit Contam Part A*, 29(6), 861-874. <https://doi.org/10.1080/19440049.2012.664570>.

Downs, S. M., Thow, A. M., Ghosh-Jerath, S., McNab, J., Reddy, K. S., & Leeder, S. R. (2013). From Denmark to Delhi: The multisectoral challenge of regulating *trans* fats in India. *Public Health Nutr*, 16(12), 2273-2280. <https://doi.org/10.1017/S1368980012004995>.

Downs, S. M., Thow, A. M., & Leeder, S. R. (2013). The effectiveness of policies for reducing dietary *trans* fat: A systematic review of the evidence. *Bull World Health Organ*, 91(4), 262-269H. <https://doi.org/10.2471/BLT.12.111468>.

Dutta-Roy, A. K. (2000). Transport mechanisms for long-chain polyunsaturated fatty acids in the human placenta. *Am J Clin Nutr*, 71(1), 315S-322S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/71.1.315S>.

Dutton, H. J. (1974). Analysis and monitoring of *trans* -isomerization by IR attenuated total reflectance spectrophotometry. *J Am Oil Chem Soc*, 51(9), 407-409. <https://doi.org/10.1007/BF02635018>.

Eckel, R. H., Borra, S., Lichtenstein, A. H., & Yin-Piazza, S. Y. (2007). Understanding the Complexity of *Trans* Fatty Acid Reduction in the American Diet: American Heart Association *Trans* Fat Conference 2006: Report of the *Trans* Fat Conference Planning Group. *Circulation*, 115(16), 2231-2246. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.181947>.

Eckel, R. H., Kris-Etherton, P., Lichtenstein, A. H., Wylie-Rosett, J., Groom, A., Stitzel, K. F., & Yin-Piazza, S. (2009). Americans' Awareness, Knowledge, and Behaviors Regarding Fats:

2006-2007. *J Am Diet Assoc*, 109(2), 288-296. <https://doi.org/10.1016/j.jada.2008.10.048>.

EFSA (European Food Safety Authority). (2004). Opinion of the scientific panel on dietetic products, nutrition and allergies on a request from the comission related to the presence of trans fatty acids (TFAs) in foods and the effect on human health of the consumption of trans fatty acids (TFAs). *EFSA J*, 81, 1-49.

EFSA (European Food Safety Authority). (2010). EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition, and Allergies (NDA); Scientific Opinion on Dietary Reference Values for fats, including saturated fatty acids, polyunsaturated fatty acids, monounsaturated fatty acids, trans fatty acids, and cholesterol. *EFSA J No. 8* (3), 1461-1567 <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1461>.

Egger, M., Smith, G. D., Schneider, M., & Minder, C. (1997). Bias in meta-analysis detected by a simple, graphical test. *BMJ*, 315(7109), 629-634. <https://doi.org/10.1136/bmj.315.7109.629>.

Elias, S. L., & Innis, S. M. (2002). Bakery foods are the major dietary source of trans-fatty acids among pregnant women with diets providing 30 percent energy from fat. *J Am Diet Assoc*, 102(1), 46-51. [https://doi.org/10.1016/S0002-8223\(02\)90015-5](https://doi.org/10.1016/S0002-8223(02)90015-5).

Endo, Y. (2018). Analytical Methods to Evaluate the Quality of Edible Fats and Oils: The JOCS Standard Methods for Analysis of Fats, Oils and Related Materials (2013) and Advanced Methods. *J Oleo Sci*, 67(1), 1-10. <https://doi.org/10.5650/jos.ess17130>.

Enig, M. G., Atal, S., Keeney, M., & Sampugna, J. (1990). Isomeric trans fatty acids in the U.S. diet. *J Am Coll Nutr*, 9(5), 471-486. <https://doi.org/10.1080/07315724.1990.10720404>.

Enríquez, L., González-Quijano, A., Ollero, R., Iglesias, M., Criado, M. R., & Matas, P. (2003). Ácidos grasos trans y nutrición. *Endocrinol Nutr*, 50(8), 317-323.

Erickson, B. (2006). Trans fat free-is it really? *Anal Chem*, 78(1), 7. <https://doi.org/10.1021/ac069344j>.

FAO/INFOODS (2012). FAO/INFOODS Guidelines for checking food composition data prior to the publication of a user table/database version 1.0. *FAO*, Rome.

FAO/WHO (Food and Agriculture Organization /World Health Organization). (2010). Fats and Fatty Acids in Human Nutrition. Report of an Expert Consultation. *WHO Press*. Geneva.

FDA, FDA Notice: Docket No. FDA-2013-N-1317 (2015). Final determination regarding partially hydrogenated oils. *Fed Reg*. 80: 34650-34670.

Fernández San Juan, PM (1991). Ácidos grasos trans insaturados. Estudio de su contenido en margarinas y grasas comestibles. *Alimentación, Equipos y Tecnología*, 281-284.

Fernández-San Juan PM (2009). Trans fatty acids (tFA): Sources and intake levels, biological effects and content in commercial Spanish food. *Nutr Hosp*, 24(5):515-20.

Ferrari, R. Ap., Schulte, E., Esteves, W., Brühl, L., & Mukherjee, K. D. (1996). Minor constituents of vegetable oils during industrial processing. *J Am Oil Chem Soc*, 73(5), 587-592. <https://doi.org/10.1007/BF02518112>.

Field, A. E., Willett, W. C., Lissner, L., & Colditz, G. A. (2007). Dietary Fat and Weight Gain Among Women in the Nurses' Health Study. *Obesity*, 15(4), 967-976. <https://doi.org/10.1038/oby.2007.616>.

Fleiss, J. (1993). Review papers: The statistical basis of meta-analysis. *Stat. Methods Med. Res.* 2(2), 121-145. <https://doi.org/10.1177/096228029300200202>.

Franko, M., Bicanic, D., & van de Bovenkamp, P. (1994). Dual beam infrared thermal lens spectrometry at 965 cm⁻¹ absorption band as a measure of nonconjugated trans fatty acids content in margarine samples. *J. Phys IV*, 04(C7), C7-479-C7-482. <https://doi.org/10.1051/jp4:19947112>.

Fritsche, J., Petersen, K. D., & Jahreis, G. (2010). *Trans* octadecenoic fatty acid (TFA) isomers

in German foods and bakery goods. *Eur J Lipid Sci Technol*, 112(12), 1363-1368. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201000379>.

FSSAI (2010). Regulation of trans fatty acids (TFAs) in partially hydrogenated vegetable oils (PHVOs). Food Safety and Standards Authority of India. *Eastern Books Co.* Lucknow, India; pp. 1-8.

Fu, H., L. Zhao, L. Yang, D. Lai, et al. (2010). Survey of trans fatty acids in foods in Chinese market. *J. Chin. Inst. Food Sci. Technol.*, 10(4), 48-52.

Galbraith, R. F. (1988). Graphical Display of Estimates Having Differing Standard Errors. *Technometrics*, 30(3), 271-281. <https://doi.org/10.1080/00401706.1988.10488400>.

Galceran, J., Ameijide, A., Carulla, M., Mateos, A., Quirós, J. R., Rojas, D., Alemán, A., Torrella, A., Chico, M., Vicente, M., Díaz, J. M., Larrañaga, N., Marcos-Gragera, R., Sánchez, M. J., Perucha, J., Franch, P., Navarro, C., Ardanaz, E., Bigorra, J., Rodrigo, P. *et al.* (2017). Cancer incidence in Spain, 2015. *Clin Transl Oncol: official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*, 19(7), 799–825. <https://doi.org/10.1007/s12094-016-1607-9>.

Galvin, S., Guillén-Sans, R., Galbis, J. A., & Guzmán-Chozas, M. (2016). Trans fatty acids in two classes of reformulated “zero trans” Spanish margarines by use of second derivative ATR-FTIR spectroscopy. *LWT - Food Science and Technology*, 65, 1066-1071. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.09.047>.

Ganguly, R., & Pierce, G. N. (2015). The toxicity of dietary trans fats. *Food Chem Toxicol*, 78, 170-176. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.02.004>.

Garsetti, M., Balentine, D. A., Zock, P. L., Blom, W. A. M., & Wanders, A. J. (2016). Fat composition of vegetable oil spreads and margarines in the USA in 2013: A national marketplace analysis. *Int J Food Sci Nutr*, 67(4), 372-382. <https://doi.org/10.3109/09637486.2016.1161012>.

Gebauer, S. K., Destailats, F., Dionisi, F., Krauss, R. M., & Baer, D. J. (2015). Vaccenic acid and trans fatty acid isomers from partially hydrogenated oil both adversely affect LDL cholesterol: A double-blind, randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr*, *102*(6), 1339-1346. <https://doi.org/10.3945/ajcn.115.116129>.

Gebauer, S. K., Psota, T. L., & Kris-Etherton, P. M. (2007). The Diversity of Health Effects of Individual trans Fatty Acid Isomers. *Lipids*, *42*(9), 787-799. <https://doi.org/10.1007/s11745-007-3095-8>.

Ghafoorunissa, G. (2008). Role of trans fatty acids in health and challenges to their reduction in Indian foods. *Asia Pac J Clin Nutr*, *17 Suppl 1*, 212-215.

Ghavami, S., Cunnington, R. H., Yeganeh, B., Davies, J. J. L., Rattan, S. G., Bathe, K., Kavosh, M., Los, M. J., Freed, D. H., Klonisch, T., Pierce, G. N., Halayko, A. J., & Dixon, I. M. C. (2012). Autophagy regulates trans fatty acid-mediated apoptosis in primary cardiac myofibroblasts. *Biochim Biophys Acta, Mol Cell Res*, *1823*(12), 2274-2286. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.09.008>.

Ghebreyesus, T. A., & Frieden, T. R. (2018). REPLACE: A roadmap to make the world trans fat free by 2023. *The Lancet*, *391*(10134), 1978-1980. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31083-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31083-3).

Ghosh, A. (2007). Comparison of anthropometric, metabolic and dietary fatty acids profiles in lean and obese dyslipidaemic Asian Indian male subjects. *Eur J Clin Nutr*, *61*(3), 412-419. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602534>.

Ginter, E., & Simko, V. (2016). New data on harmful effects of trans-fatty acids. *Bratisl Med J*, *117*(05), 251-253. https://doi.org/10.4149/BLL_2016_048.

Gómez-Cortés, P., de la Fuente, M. Ángel, & Juárez, M. (2019). Ácidos grasos trans y ácido linoleico conjugado en alimentos: Origen y propiedades biológicas. *Nutr Hosp*, *36*(2), 479-486. <https://doi.org/10.20960/nh.2466>.

Gómez-Cortés, P., Juárez, M., & de la Fuente, M. A. (2018). Milk fatty acids and potential health benefits: An updated vision. *Trends Food Sci Technol*, *81*, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.08.014>.

González-Rámila, S., Mateos, R., García-Cordero, J., Seguido, M. A., Bravo-Clemente, L., & Sarriá, B. (2022). Olive Pomace Oil versus High Oleic Sunflower Oil and Sunflower Oil: A Comparative Study in Healthy and Cardiovascular Risk Humans. *Foods*, *11*(15), 2186. <https://doi.org/10.3390/foods11152186>.

Gotzsche, P. C. (2000). Why we need a broad perspective on meta-analysis. *BMJ*, *321*(7261), 585-586. <https://doi.org/10.1136/bmj.321.7261.585>.

Griffiths HN, H. T. (1932). The interconversion of cis- and trans-modifications of monoethylenic higher fatty acids by nitrogen trioxide (the “elaidin” reaction). *J Chem Soc*, 2315-2324.

Grimm, M. O. W., Rothhaar, T. L., Grösgen, S., Burg, V. K., Hundsdörfer, B., Hauptenthal, V. J., Friess, P., Kins, S., Grimm, H. S., & Hartmann, T. (2012). Trans fatty acids enhance amyloidogenic processing of the Alzheimer amyloid precursor protein (APP). *J Nutr Biochem*, *23*(10), 1214-1223. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2011.06.015>.

Guasch-Ferré, M., Li, Y., Willett, W. C., Sun, Q., Sampson, L., Salas-Salvadó, J., Martínez-González, M. A., Stampfer, M. J., & Hu, F. B. (2022). Consumption of Olive Oil and Risk of Total and Cause-Specific Mortality Among U.S. Adults. *J Am Coll Cardiol*, *79*(2), 101-112. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2021.10.041>.

Guillén, M. D., & Cabo, N. (1999). Usefulness of the frequencies of some Fourier transform infrared spectroscopic bands for evaluating the composition of edible oil mixtures. *Lipid - Fett*, *101*(2), 71-76. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4133\(19992\)101:2<71::AID-LIPI71>3.0.CO;2-Z](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4133(19992)101:2<71::AID-LIPI71>3.0.CO;2-Z).

Gutiérrez-Luna, K., Astiasarán, I., & Ansorena, D. (2019). Quality assessment of the lipid

fraction in industrial and artisan biscuits commercialized in Navarre (Spain). *LWT- Food Sci Technol*, 109, 436-442. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.04.056>.

Hadj Ahmed, S., Kharroubi, W., Kaoubaa, N., Zarrouk, A., Batbout, F., Gamra, H., Najjar, M. F., Lizard, G., Hininger-Favier, I., & Hammami, M. (2018). Correlation of trans fatty acids with the severity of coronary artery disease lesions. *Lipids in Health and Disease*, 17(1), 52. <https://doi.org/10.1186/s12944-018-0699-3>.

Hatt, H., & Lamberton, J. (1955). Geometric isomerism in some unsaturated aliphatic ketones. *Aust J Chem*, 8(4), 506. <https://doi.org/10.1071/CH9550506>.

Hayes, K. C., & Pronczuk, A. (2010). Replacing Trans Fat: The Argument for Palm Oil with a Cautionary Note on Interesterification. *J Am Coll Nutr*, 29(sup3), 253S-284S. <https://doi.org/10.1080/07315724.2010.10719842>.

Health Canada (2006). Transforming the food supply: Report of the Trans Fat Task. Force submitted to the Minister of Health Canada. Ottawa.

Health Council for the Netherlands (2006). Guidelines for a healthy diet. Publication no. 2006/21. Health Council of the Netherlands. The Hague.

Helldan A, Raulio S, Kosola M, Tapanainen H, Ovaskainen ML & Smith S (2013). The National FINDIET 2012 Survey National Institute for Health and Welfare. Tampere, Finland.

Hénon, G., Kemény, Zs., Recseg, K., Zwobada, F., & Kovari, K. (1999). Deodorization of vegetable oils. Part I: Modelling the geometrical isomerization of polyunsaturated fatty acids. *J Am Oil Chem Soc*, 76(1), 73-81. <https://doi.org/10.1007/s11746-999-0050-2>.

Herrera, M. L., Rodríguez-Batiller, M. J., Rincón-Cardona, J. A., Agudelo-Laverde, L. M., Martini, S., & Candal, R. J. (2015). Effect of Cooling Rate and Temperature Cycles on Polymorphic Behavior of Sunflower Oil Stearins for Applications as Trans-fat Alternatives in Foods. *Food Bioprocess Tech*, 8(8), 1779-1790. <https://doi.org/10.1007/s11947-015-1535-7>.

Higgins, J. P. T., & Thompson, S. G. (2002). Quantifying heterogeneity in a meta-analysis. *Stat Med*, 21(11), 1539-1558. <https://doi.org/10.1002/sim.1186>.

Hirko, K. A., Chai, B., Spiegelman, D., Campos, H., Farvid, M. S., Hankinson, S. E., Willett, W. C., & Eliassen, A. H. (2018). Erythrocyte membrane fatty acids and breast cancer risk: A prospective analysis in the nurses' health study II. *Int J Cancer*, 142(6), 1116-1129. <https://doi.org/10.1002/ijc.31133>.

Hosmer C. Does «no trans fat» really mean no trans fat? Harvard heart letter: From Harvard Medical School. 2006, 17(2), 8-10.

Hu, F. B., Liu, S., & van Dam, R. M. (2001). Diet and risk of Type II diabetes: The role of types of fat and carbohydrate. *Diabetologia*, 44(7), 805-817. <https://doi.org/10.1007/s001250100547>.

Hu, F. B., Stampfer, M. J., Manson, J. E., Rimm, E., Colditz, G. A., Rosner, B. A., Hennekens, C. H., & Willett, W. C. (1997). Dietary Fat Intake and the Risk of Coronary Heart Disease in Women. *N Engl J Med*, 337(21), 1491-1499. <https://doi.org/10.1056/NEJM199711203372102>.

Hu, J., Vecchia, C. L., De Groh, M., Negri, E., Morrison, H., & Mery, L. (2011). Dietary trans fatty acids and cancer risk. *Eur J Cancer Prev*, 20(6), 530-538. <https://doi.org/10.1097/CEJ.0b013e328348fbfb>.

Huang, L., Ojo, A. E., Kimiywe, J., Kibet, A., Ale, B. M., Okoro, C. E., Louie, J., Taylor, F., Huffman, M. D., Ojji, D. B., Wu, J. H. Y., & Marklund, M. (2023). Presence of trans-Fatty Acids Containing Ingredients in Pre-Packaged Foods and the Availability of Reported trans-Fat Levels in Kenya and Nigeria. *Nutrients*, 15(3), 761. <https://doi.org/10.3390/nu15030761>.

Hulshof, K., van Erp-Baart, M., Anttolainen, M., Becker, W., Church, S., Couet, C., Hermann-Kunz, E., Kesteloot, H., Leth, T., Martins, I., Moreiras, O., Moschandreas, J., Pizzoferrato, L., Rimestad, A., Thorgeirsdottir, H., van Amelsvoort, J., Aro, A., Kafatos, A., Lanzmann-Petithory, D., & van Poppel, G. (1999). Intake of fatty acids in Western Europe with emphasis on trans fatty acids: The TRANSFAIR study. *Eur J Clin Nutr*, 53(2), 143-157.

<https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1600692>.

Hunter, J. E. (2006). Dietary trans fatty acids: Review of recent human studies and food industry responses. *Lipids*, 41(11), 967-992. <https://doi.org/10.1007/s11745-006-5049-y>.

Hunter, J., & Applewhite, T. (1991). Reassessment of trans fatty acid availability in the US diet. *Am J Clin Nutr*, 54(2), 363-369. <https://doi.org/10.1093/ajcn/54.2.363>.

Hunter, J. E., & Schmidt, F. L. (2000). Fixed Effects vs. Random Effects Meta-Analysis Models: Implications for Cumulative Research Knowledge. *Int J Syst Assess*, 8(4), 275-292. <https://doi.org/10.1111/1468-2389.00156>.

Hwang, H.-S. (2020). A critical review on structures, health effects, oxidative stability, and sensory properties of oleogels. *Biocatal Agric Biotechnol*, 26, 101657. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101657>.

Hyvönen, L. (1996). Approach to fat analysis of foods. *Food Chem*, 57, 23-26.

Idris NA & Dian NL (2005). Inter-esterified palm products as alternatives to hydrogenation. *Asia Pac J Clin Nutr*, 14(4), 396-401.

IFBA (International Food and Beverage Alliance) (2019). International Food and Beverage Alliance (IFBA) enhanced commitment to phase out industrially produced trans fatty acids. *IFBA*. Geneva.

Innis, S. M. (2007). Fatty acids and early human development. *Early Hum Dev*, 83(12), 761-766. <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2007.09.004>.

Innis, S. M., Green, T. J., & Halsey, T. K. (1999). Variability in the Trans Fatty Acid Content of Foods within a Food Category: Implications for Estimation of Dietary Trans Fatty Acid Intakes. *J Am Coll Nutr*, 18(3), 255-260. <https://doi.org/10.1080/07315724.1999.10718860>.

Innis, S. M., & King, D. J. (1999). Trans Fatty acids in human milk are inversely associated with concentrations of essential all-cis n-6 and n-3 fatty acids and determine trans, but not n-6 and n-3, fatty acids in plasma lipids of breast-fed infants. *Am J Clin Nutr*, 70(3), 383-390. <https://doi.org/10.1093/ajcn/70.3.383>.

Ismail, G., Abo El Naga, R., El Sayed Zaki, M., Jabbour, J., & Al-Jawaldeh, A. (2021). Analysis of Fat Content with Special Emphasis on Trans Isomers in Frequently Consumed Food Products in Egypt: The First Steps in the Trans Fatty Acid Elimination Roadmap. *Nutrients*, 13(9), 3087. <https://doi.org/10.3390/nu13093087>.

Itcho, K., Yoshii, Y., Ohno, H., Oki, K., Shinohara, M., Irino, Y., Toh, R., Ishida, T., Hirata, K., & Yoneda, M. (2017). Association between Serum Elaidic Acid Concentration and Insulin Resistance in Two Japanese Cohorts with Different Lifestyles. *J Atheroscler Thromb*, 24(12), 1206-1214. <https://doi.org/10.5551/jat.39164>.

Iwata, N. G., Pham, M., Rizzo, N. O., Cheng, A. M., Maloney, E., & Kim, F. (2011). Trans Fatty Acids Induce Vascular Inflammation and Reduce Vascular Nitric Oxide Production in Endothelial Cells. *PLoS ONE*, 6(12), e29600. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029600>.

Jahreis, G., Fritsche, J., & Steinhart, H. (1996). Monthly variations of milk composition with special regard to fatty acids depending on season and farm management systems - Conventional versus ecological. *Lipid/Fett*, 98(11), 356-359. <https://doi.org/10.1002/lipi.19960981103>.

Jakobsen, M. U., Overvad, K., Dyerberg, J., & Heitmann, B. L. (2008). Intake of ruminant trans fatty acids and risk of coronary heart disease. *Int J Epidemiol*, 37(1), 173-182. <https://doi.org/10.1093/ije/dym243>.

Jart A (1960). The infrared absorption spectra of some mono-unsaturated and saturated fatty acids and esters. *Acta Chem Scand*, 14(9), 1867-1878.

Jimenez-Lopez, C., Carpena, M., Lourenço-Lopes, C., Gallardo-Gomez, M., Lorenzo, J. M., Barba, F. J., Prieto, M. A., & Simal-Gandara, J. (2020). Bioactive Compounds and Quality of

Extra Virgin Olive Oil. *Foods*, 9(8), 1014. <https://doi.org/10.3390/foods9081014>.

Johnston PV, Johnson OC, & Kummerow FA (1957). Occurrence of trans fatty acids in human tissue. *Science (Washington, DC. United States)*, 126, 698-699.

Kadhun, A. A. H., & Shamma, M. N. (2017). Edible lipids modification processes: A review. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 57(1), 48-58. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.848834>.

Kakisu, E., Tomchinsky, E., Victoria Lipps, M., & Fuentes, J. (2018). Analysis of the reduction of trans-fatty-acid levels in the foods of Argentina. *Int J Food Sci Nutr*, 69(8), 928-937. <https://doi.org/10.1080/09637486.2018.1428537>.

Kala, A.L. (2012). Cis-, trans- and Saturated Fatty Acids in Selected Hydrogenated and Refined Vegetable Oils in the Indian Market. *J Am Oil Chem Soc*, 89, 1813-1821.

Kandhro, A., Sherazi, S. T. H., Mahesar, S. A., Bhangar, M. I., Younis Talpur, M., & Rauf, A. (2008). GC-MS quantification of fatty acid profile including trans FA in the locally manufactured margarines of Pakistan. *Food Chem*, 109(1), 207-211. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.12.029>.

Karim, Z., Khan, K. M., Ahmed, S., & Karim, A. (2014). Assessment of Trans Fatty Acid Level in French Fries from Various Fast Food Outlets in Karachi, Pakistan. *J Am Oil Chem Soc*, 91(11), 1831-1836. <https://doi.org/10.1007/s11746-014-2530-2>.

Karunathilaka, S. R., Farris, S., & Mossoba, M. M. (2018). Portable Mid-Infrared Device and Chemometrics for the Prediction of Low (0.5%) Total Trans Fat Content in Fast Foods. *J Oleo Sci*, 67(12), 1501-1510. <https://doi.org/10.5650/jos.ess18098>.

Katan MB (1995). Exist trans fatty acids. *Lancet*, 346, 1245-1246.

Katan, M. B. (2006). Regulation of trans fats: The gap, the Polder, and McDonald's French fries. *Atheroscler Suppl*, 7(2), 63-66.

Khan, M. U., Hassan, M. F., & Rauf, A. (2017). Determination of *trans* Fat in Selected Fast Food Products and Hydrogenated Fats of India Using Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR) Spectroscopy. *J Oleo Sci*, 66(3), 251-257. <https://doi.org/10.5650/jos.ess16168>.

Kim, M. K., & Campos, H. (2003). Intake of *trans* fatty acids and low-density lipoprotein size in a Costa Rican population. *Metabolism*, 52(6), 693-698. [https://doi.org/10.1016/S0026-0495\(03\)00029-5](https://doi.org/10.1016/S0026-0495(03)00029-5).

Kinsella, J. E., Bruckner, G., Mai, J., & Shimp, J. (1981). Metabolism of *trans* fatty acids with emphasis on the effects of *trans*, *trans*-octadecadienoate on lipid composition, essential fatty acid, and prostaglandins: An overview. *Am J Clin Nutr*, 34(10), 2307-2318. <https://doi.org/10.1093/ajcn/34.10.2307>.

Koh-Banerjee, P., Chu, N.-F., Spiegelman, D., Rosner, B., Colditz, G., Willett, W., & Rimm, E. (2003). Prospective study of the association of changes in dietary intake, physical activity, alcohol consumption, and smoking with 9-y gain in waist circumference among 16 587 US men. *Am J Clin Nutr*, 78(4), 719-727. <https://doi.org/10.1093/ajcn/78.4.719>.

Kohlmeier, L., Simonsen, N., van 't Veer, P., Strain, J. J., Martin-Moreno, J. M., Margolin, B., Huttunen, J. K., Fernández-Crehuet Navajas, J., Martin, B. C., Thamm, M., Kardinaal, A. F., & Kok, F. J. (1997). Adipose tissue *trans* fatty acids and breast cancer in the European Community Multicenter Study on Antioxidants, Myocardial Infarction, and Breast Cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: A publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 6(9), 705–710.

Kohn, A., & Mitchell, B. (2006). Analysis of *trans* fatty acids. *Lipid Technol*, 18(12), 279-282. <https://doi.org/10.1002/lite.200690004>.

Koletzko, B., & Müller, J. (1990). *Cis*- and *Trans*-Isomeric Fatty Acids in Plasma Lipids of Newborn Infants and Their Mothers. *Neonatology*, 57(3-4), 172-178. <https://doi.org/10.1159/000243188>.

- Korver, O., & Katan, M. B. (2006). The Elimination of Trans Fats from Spreads: How Science Helped to Turn an Industry Around. *Nutr Rev*, 64(6), 275-279. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2006.tb00210.x>.
- Kris-Etherton, P. M., Innis, S., American Dietetic Association, & Dietitians of Canada (2007). Position of the American Dietetic Association and Dietitians of Canada: dietary fatty acids. *J Am Diet Assoc*, 107(9), 1599–1611.
- Kromhout, D., Geleijnse, J. M., Menotti, A., & Jacobs, D. R. (2011). The confusion about dietary fatty acids recommendations for CHD prevention. *Br J Nutr*, 106(5), 627-632. <https://doi.org/10.1017/S0007114511002236>.
- Kuhnt, K., Baehr, M., Rohrer, C., & Jahreis, G. (2011). *Trans* fatty acid isomers and the *trans* -9/ *trans* -11 index in fat containing foods. *Eur J Lipid Sci Technol*, 113(10), 1281-1292. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201100037>.
- Kummerow, F. A. (2009). The negative effects of hydrogenated trans fats and what to do about them. *Atheroscler*, 205(2), 458-465. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2009.03.009>.
- L'Abbé, M. R., Stender, S., Skeaff, C. M., Ghafoorunissa, & Tavella, M. (2009). Approaches to removing trans fats from the food supply in industrialized and developing countries. *Eur J Clin Nutr*, 63(S2), S50-S67. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2009.14>.
- Laloux, L., du Chaffaut, L., Razanamahefa, L., & Lafay, L. (2007). *Trans* fatty acid content of foods and intake levels in France. *Eur J Lipid Sci Technol*, 109(9), 918-929. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200600278>.
- Larqué, E., Garaulet, M., Pérez-Llamas, F., Zamora, S., & Tebar, F. J. (2003). Fatty acid composition and nutritional relevance of most widely consumed margarines in Spain. *Grasas y Aceites*, 54(1), 65-70. <https://doi.org/10.3989/gya.2003.v54.i1.279>.
- Larqué, E., Zamora, S., & Gil, A. (2001). Dietary trans fatty acids in early life: A review. *Early*

Hum Dev, 65, S31-S41. [https://doi.org/10.1016/S0378-3782\(01\)00201-8](https://doi.org/10.1016/S0378-3782(01)00201-8).

Larsson, I., Lissner, L., & Wilhelmsen, L. (1999). The 'Green Keyhole' revisited: Nutritional knowledge may influence food selection. *Eur J Clin Nutr*, 53(10), 776-780. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1600839>.

Ledoux, M., Juanéda, P., & Sébédio, J. (2007). *Trans* fatty acids: Definition and occurrence in foods. *Eur J Lipid Sci Technol*, 109(9), 891-900. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200600276>.

Léger, C., Razanamahefa, L., & Margaritis, I. (2007). Health risks and benefits of trans fatty acids including conjugated fatty acids in food – Synopsis of the AFSSA report and recommendations. *Eur J Lipid Sci Technol*, 109(9), 887-890. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200600275>.

Lemon, H. W., & Cross, C. K. (1949). The significance of an absorption band at 968 cm^{-1} in the infrared spectrum of methyl isolinoleate. *Can J Res*, 27b(7), 610-615. <https://doi.org/10.1139/cjr49b-060>.

León-Camacho, M., Ruiz-Méndez, M. V., & Graciani-Constante, E. (1999). Isomerization of fatty acids during deodorization and physical refining—Stripping with nitrogen. *Lipid - Fett*, 101(8), 290-294. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4133\(199908\)101:8<290::AID-LIPI290>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4133(199908)101:8<290::AID-LIPI290>3.0.CO;2-W).

Leth, T., Jensen, H. G., Mikkelsen, A. Æ., & Bysted, A. (2006). The effect of the regulation on trans fatty acid content in Danish food. *Atheroscler Suppl.*, 7(2), 53-56. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2006.04.019>.

Lewis, S. (2001). Forest plots: Trying to see the wood and the trees. *BMJ*, 322(7300), 1479-1480. <https://doi.org/10.1136/bmj.322.7300.1479>.

Li, C., Cobb, L. K., Vesper, H. W., & Asma, S. (2019). Global Surveillance of *trans* -Fatty Acids. *Prev Chronic Dis*, 16, 190121. <https://doi.org/10.5888/pcd16.190121>.

List, G.R (2004). Processing and reformulation for nutrition labeling of trans fatty acids. *Lipid Technol*, 16(8), 175-179.

Lope, V., Guerrero-Zotano, Á., Casas, A., Baena-Cañada, J. M., Bermejo, B., Pérez-Gómez, B., Criado-Navarro, I., Antolín, S., Sánchez-Rovira, P., Ramos-Vázquez, M., Antón, A., Castelló, A., García-Saénz, J. Á., Muñoz, M., De Juan, A., Andrés, R., Llombart-Cussac, A., Hernando, B., Franquesa, R. M., ... Pollán, M. (2020). Serum Phospholipids Fatty Acids and Breast Cancer Risk by Pathological Subtype. *Nutrients*, 12(10), 3132. <https://doi.org/10.3390/nu12103132>.

Lopez-Garcia, E., Schulze, M. B., Meigs, J. B., Manson, J. E., Rifai, N., Stampfer, M. J., Willett, W. C., & Hu, F. B. (2005). Consumption of Trans Fatty Acids Is Related to Plasma Biomarkers of Inflammation and Endothelial Dysfunction. *J Nutr*, 135(3), 562-566. <https://doi.org/10.1093/jn/135.3.562>.

Lozano-Castellón, J., López-Yerena, A., Domínguez-López, I., Siscart-Serra, A., Fraga, N., Sámano, S., López-Sabater, C., Lamuela-Raventós, R. M., Vallverdú-Queralt, A., & Pérez, M. (2022). Extra virgin olive oil: A comprehensive review of efforts to ensure its authenticity, traceability, and safety. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 21(3), 2639-2664. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12949>.

MacIntyre, U. E., Kruger, H. S., Venter, C. S., & Vorster, H. H. (2002). Dietary intakes of an African population in different stages of transition in the North West Province, South Africa: The THUSA study. *Nutr Res*, 22(3), 239-256. [https://doi.org/10.1016/S0271-5317\(01\)00392X](https://doi.org/10.1016/S0271-5317(01)00392X).

Malvis, A., Šimon, P., Dubaj, T., Sládková, A., Ház, A., Jablonský, M., Sekretár, S., Schmidt, Š., Kreps, F., Burčová, Z., Hodaifa, G., & Šurina, I. (2019). Determination of the Thermal Oxidation Stability and the Kinetic Parameters of Commercial Extra Virgin Olive Oils from Different Varieties. *J Chem*, 2019, 1-8. <https://doi.org/10.1155/2019/4567973>.

MAPAMA (2022). Dirección General de Política Alimentaria. Ministerio de Agricultura,

Pesca, Alimentación y Medio Ambiente. Madrid.

Marangoni, F., Galli, C., Ghiselli, A., Lercker, G., La Vecchia, C., Maffei, C., Agostoni, C., Ballardini, D., Brignoli, O., Faggiano, P., Giacco, R., Macca, C., Magni, P., Marelli, G., Marrocco, W., Miniello, V. L., Mureddu, G. F., Pellegrini, N., Stella, R., Troiano, E; Verduci, E; Volpe, R., Poli, A. (2017). Palm oil and human health. Meeting report of NFI: Nutrition Foundation of Italy symposium. *Int J Food Sci Nutr*, 68(6), 643-655. <https://doi.org/10.1080/09637486.2016.1278431>.

Martin-Saborido, C., Mouratidou, T., Livaniou, A., Caldeira, S., & Wollgast, J. (2016). Public health economic evaluation of different European Union–level policy options aimed at reducing population dietary *trans* fat intake. *Am J Clin Nutr*, 104(5), 1218-1226. <https://doi.org/10.3945/ajcn.116.136911>.

Martínez Martín, F. J., & dePablos Velasco, P. (2007). Cañones o margarina: La grasa *trans* y el riesgo cardiovascular. *Clin Investig Arterioscler*, 19(1), 39-48. [https://doi.org/10.1016/S0214-9168\(07\)74170-0](https://doi.org/10.1016/S0214-9168(07)74170-0).

Matthan, N. R., Welty, F. K., Barrett, P. H. R., Harausz, C., Dolnikowski, G. G., Parks, J. S., Eckel, R. H., Schaefer, E. J., & Lichtenstein, A. H. (2004). Dietary Hydrogenated Fat Increases High-Density Lipoprotein apoA-I Catabolism and Decreases Low-Density Lipoprotein apoB-100 Catabolism in Hypercholesterolemic Women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24(6), 1092-1097. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000128410.23161.be>.

McCarthy J, Barr D, Sinclair A. (2008). Determination of *trans* fatty acid levels by FTIR in processed foods in Australia. *Asia Pac J Clin Nutr*, 17(3), 391-396.

McCarthy, M. (2013). US moves to ban *trans* fats. *BMJ*, 347, f6749-f6749. <https://doi.org/10.1136/bmj.f6749>.

Mello, M. M. (2009). New York City's War on Fat. *N Engl J Med*, 360(19), 2015-2020. <https://doi.org/10.1056/NEJMh1e0806121>.

Mensink, R. P., & Katan, M. B. (1990). Effect of dietary *trans* fatty acids on high-density and low-density lipoprotein cholesterol levels in healthy subjects. *N Engl J Med*, 323(7), 439-445. <https://doi.org/10.1056/NEJM199008163230703>.

Mensink RP, Zock PL, Katan MB & Hornstra G (1992). Effect of dietary cis and *trans* fatty acids on serum lipoprotein[a] levels in humans. *J Lipid Res*, 33(10), 1493-501.

Micha, R., Khatibzadeh, S., Shi, P., Fahimi, S., Lim, S., Andrews, K. G., Engell, R. E., Powles, J., Ezzati, M., Mozaffarian, D., & on behalf of the Global Burden of Diseases Nutrition and Chronic Diseases Expert Group (NutriCoDE). (2014). Global, regional, and national consumption levels of dietary fats and oils in 1990 and 2010: A systematic analysis including 266 country-specific nutrition surveys. *BMJ*, 348, g2272-g2272. <https://doi.org/10.1136/bmj.g2272>.

Milosevic M, Milosevic V, Kramer John KG, Azizirian H, Mossoba Magdi M. (2004). Determining low level of *trans* fatty acids in foods using an improved ATR-FTIR procedure. *Lipid Technol*, 16(11), 252-255.

Mínguez-Alarcón, L., Chavarro, J., Mendiola, J., Roca, M., Tanrikut, C., Vioque, J., Jørgensen, N., & Torres-Cantero, A. (2017). Fatty acid intake in relation to reproductive hormones and testicular volume among young healthy men. *Asian J. Androl.* 19(2), 184. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.190323>.

Mirabella FM (ed) (1992). Internal reflection spectroscopy, Practical Spectroscopy Series. Vol 15. Marcel Dekker. New York.

Mitcham, D., Bailey, A. V., & Tripp, V. W. (1973). Identification of fatty acid polymorphic modifications by infrared spectroscopy. *J Am Oil Chem Soc*, 50(11), 446-449. <https://doi.org/10.1007/BF02639851>.

Miyake, Y., Yokomizo, K., & Matsuzaki, N. (1998). Determination of unsaturated fatty acid composition by high-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Am Oil Chem Soc*,

75(12), 1091-1094. <https://doi.org/10.1007/s11746-998-0295-1>.

Moher, D., Liberati, A., Tetzlaff, J., Altman, D. G., & The PRISMA Group. (2009). Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement. *PLoS Med*, 6(7), e1000097. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000097>.

Monge-Rojas, R., Colón-Ramos, U., Jacoby, E., Alfaro, T., Tavares do Carmo, M. das G., Villalpando, S., & Bernal, C. (2017). Progress towards elimination of *trans* -fatty acids in foods commonly consumed in four Latin American cities. *Public Health Nutr*, 20(13), 2440-2449. <https://doi.org/10.1017/S1368980017001227>.

Monge-Rojas, R., Colón-Ramos, U., Jacoby, E., & Mozaffarian, D. (2011). Voluntary reduction of *trans*-fatty acids in Latin America and the Caribbean: Current situation. *Rev Panam Salud Públ*, 29(2), 126-129. <https://doi.org/10.1590/S1020-49892011000200008>.

Moreiras O, Carbajal A, Cabrera L, Cuadrado C (2011). Tablas de composición de alimentos. 15ª ed. Ed. Pirámide. Madrid.

Moreno Alcalde, S. (2014). Contenido de ácidos grasos *trans* en alimentos comercializados en la Comunidad de Madrid (España). *Nutr Hosp*, 29 (1), 180-186. <https://doi.org/10.3305/nh.2014.29.1.6980>.

Morin O. (2005). Trans fatty acids: New developments. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides (OCL)*, 12(5-6), 414-421.

Morris, M. C., Evans, D. A., Bienias, J. L., Tangney, C. C., & Wilson, R. S. (2004). Dietary fat intake and 6-year cognitive change in an older biracial community population. *Neurology*, 62(9), 1573-1579. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000123250.82849.B6>.

Morris, M. C., & Tangney, C. C. (2014). Dietary fat composition and dementia risk. *Neurobiol Aging* 35, S59-S64. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.03.038>.

Morris, D. H., & Vaisey-Genser, M. (2003). Margarine | Dietary Importance. *EFSN*, 3719-3725. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/00741-0>.

Moss, J. (2006). Labeling of *trans* fatty acid content in food, regulations and limits—The FDA view. *Atheroscler Suppl*, 7(2), 57-59. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosisissup.2006.04.012>.

Mossoba, M.M., Adam, M., Lee, T. (2001). Rapid determination of total *trans* fat content. An attenuated total reflection infrared spectroscopy international collaborative study. *J. AOAC Int.* 84, 1144-1150.

Mossoba, M. M., Kramer, J. K. G., Azizian, H., Kraft, J., Delmonte, P., Kia, A.-R. F., Bueso, F. J., Rader, J. I., & Lee, J. K. (2012). Application of a Novel, Heated, Nine-Reflection ATR Crystal and a Portable FTIR Spectrometer to the Rapid Determination of Total Trans Fat. *J Am Oil Chem Soc*, 89(3), 419-429. <https://doi.org/10.1007/s11746-011-1930-9>.

Mossoba, M. M., Milosevic, V., Milosevic, M., Kramer, J. K. G., & Azizian, H. (2007). Determination of total *trans* fats and oils by infrared spectroscopy for regulatory compliance. *Anal Bioanal Chem*, 389(1), 87-92. <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1262-7>.

Mossoba MM, Moss J, & Kramer JK. (2009a). *Trans* fat labeling and levels in U.S. foods: assessment of gas chromatographic and infrared spectroscopic techniques for regulatory compliance. *J AOAC Int.* 92(5):1284-300.

Mossoba, MM. Sehat N., Yurawecz, M.P., McDonald, R.E., Kramer, J.K.G., Adam, M. et al. (1998). Attenuated total reflection (ATR) infrared spectroscopy. *GIT Labor-Fachzeitschrift* 42 (5), 500, 502-503.

Mossoba, M. M., Seiler, A., Kramer, J. K. G., Milosevic, V., Milosevic, M., Azizian, H., & Steinhart, H. (2009b). Nutrition Labeling: Rapid Determination of Total *trans* Fats by Using Internal Reflection Infrared Spectroscopy and a Second Derivative Procedure. *J Am Oil Chem Soc*, 86(11), 1037. <https://doi.org/10.1007/s11746-009-1444-x>.

Mossoba, M. M., Seiler, A., Steinhart, H., Kramer, J. K. G., Rodrigues-Saona, L., Griffith, A. P., Pierceall, R., van de Voort, F. R., Sedman, J., Ismail, A. A., Barr, D., Da Costa Filho, P. A., Li, H., Zhang, Y., Liu, X., & Bradley, M. (2011). Regulatory Infrared Spectroscopic Method for the Rapid Determination of Total Isolated *Trans* Fat: A Collaborative Study. *J Am Oil Chem Soc*, 88(1), 39-46. <https://doi.org/10.1007/s11746-010-1648-0>.

Mossoba, M. M., Srigley, C. T., Farris, S., Kramer, J. K. G., Chirtel, S., & Rader, J. (2014). Evaluation of the Performance of a Portable Mid-Infrared Analyzer for the Rapid Determination of Total *Trans* Fat in Fast Food. *J Am Oil Chem Soc*, 91(10), 1651-1663. <https://doi.org/10.1007/s11746-014-2521-3>.

Mossoba, M. M., Yurawecz, M. P., & McDonald, R. E. (1996). Rapid determination of the total *trans* content of neat hydrogenated oils by attenuated total reflection spectroscopy. *J Am Oil Chem Soc*, 73(8), 1003-1009. <https://doi.org/10.1007/BF02523408>.

Motard-Bélanger, A., Charest, A., Grenier, G., Paquin, P., Chouinard, Y., Lemieux, S., Couture, P., & Lamarche, B. (2008). Study of the effect of *trans* fatty acids from ruminants on blood lipids and other risk factors for cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr*, 87(3), 593-599. <https://doi.org/10.1093/ajcn/87.3.593>.

Mouratidou T, Livaniou A, Saborido CM, Wollgast J & Caldeira S JRC (2014). *Trans* fatty acids in Europe: where do we stand? A Synthesis of the Evidence: 2003–2013. JRC Science and Policy Reports. Luxembourg: Publications Office of the European Union.

Mozaffarian, D. (2006 a). *Trans* fatty acids – Effects on systemic inflammation and endothelial function. *Atheroscler Suppl*, 7(2), 29-32.

Mozaffarian, D., Jacobson, M. F., & Greenstein, J. S. (2010). Food Reformulations to Reduce *Trans* Fatty Acids. *N Engl J Med*, 362(21), 2037-2039. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1001841>.

Mozaffarian, D., Katan, M. B., Ascherio, A., Stampfer, M. J., & Willett, W. C. (2006 b). *Trans*

Fatty Acids and Cardiovascular Disease. *N Engl J Med*, 354(15), 1601-1613. <https://doi.org/10.1056/NEJMra054035>.

Mozaffarian, D., & Ludwig, D. S. (2010). Dietary Guidelines in the 21st Century—A Time for Food. *JAMA*, 304(6), 681. <https://doi.org/10.1001/jama.2010.1116>.

Mozaffarian, D., Pischon, T., Hankinson, S. E., Rifai, N., Joshipura, K., Willett, W. C., & Rimm, E. B. (2004). Dietary intake of *trans* fatty acids and systemic inflammation in women. *Am J Clin Nutr*, 79(4), 606-612. <https://doi.org/10.1093/ajcn/79.4.606>.

Mozaffarian, D., & Willett, W. C. (2007). *Trans* fatty acids and cardiovascular risk: A unique cardiometabolic imprint? *Curr Atheroscler Rep*, 9(6), 486-493. <https://doi.org/10.1007/s11883-007-0065-9>.

Müller, H., Kirkhus, B., & Pedersen, J. I. (2001). Serum cholesterol predictive equations with special emphasis on *trans* and saturated fatty acids. An analysis from designed controlled studies. *Lipids*, 36(8), 783-791. <https://doi.org/10.1007/s11745-001-0785-6>.

Murray Skeaff, C., & Gowans, S. (2006). Home use of margarine is an important determinant of plasma *trans* fatty acid status: A biomarker study. *Br J Nutr*, 96(2), 377-383. <https://doi.org/10.1079/BJN20061737>.

Nestel, P. (2014). *Trans* fatty acids: Are its cardiovascular risks fully appreciated? *Clin Ther*, 36(3), 315-321. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2014.01.020>.

Nigam, A.G. (2000). Consumption of fat in Indian diet. *Diab. Dev. Count.* 20, 58-61.

Nor Aini, I., & Miskandar, M. S. (2007). Utilization of palm oil and palm products in shortenings and margarines. *Eur J Lipid Sci Technol*, 109(4), 422-432. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200600232>.

Okamoto T., Matsuzuki H., Maruyama T., Niija I., Sugamo M (1999). *Trans* fatty acid content

in hydrogenated oils and estimate intake. *Nihon Yukaga Khaishi*, 48(12): 1411-1414.

Okie, S. (2007). New York to *Trans* Fats: You're Out! *N Engl J Med*, 356(20), 2017-2021. <https://doi.org/10.1056/NEJMp078058>.

OMS (Organización Mundial de la Salud). (2004). Global strategy on diet, physical activity and health. Fifty-seventh World Health Assembly. Geneva.

OMS (Organización Mundial de la Salud). (2015). Eliminating Trans Fats in Europe: A policy brief. WHO Regional Office for Europe. Copenhagen.

OMS (Organización Mundial de la Salud) (2019). Countdown to 2023: WHO report on global *trans* fat determination. World Health Organization. Geneva.

Oomen, C. M., Ocké, M. C., Feskens, E. J., Erp-Baart, M.-A. J. van, Kok, F. J., & Kromhout, D. (2001). Association between trans fatty acid intake and 10-year risk of coronary heart disease in the Zutphen Elderly Study: A prospective population-based study. *The Lancet*, 357(9258), 746-751. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)04166-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04166-0).

OPS (Organización Panamericana de la Salud) (2020). Plan de acción para eliminar los ácidos grasos trans de producción industrial 2020-2025.

Ovesen, L., Leth, T., & Hansen, K. (1998). Fatty acid composition and contents of trans monounsaturated fatty acids in frying fats, and in margarines and shortenings marketed in Denmark. *J Am Oil Chem Soc*, 75(9), 1079-1083. <https://doi.org/10.1007/s11746-998-0116-6>.

Ozay G, Yildiz M, Mahidin MR, Yusof MSA, Yurdagul M & Gokcen N (1998). Formulation of *trans*-free fatty acid margarines. En: Koseoglu SS, Rhee KC, Wilson, Richard F (eds). Proceedings of the World Conference on Oilseed and Edible Oils Processing. Vol 1, 143-146, Istanbul. *AOCS Press, Champaign, Ill.*

Pande, G., & Akoh, C.C (2013). Enzymatic synthesis of trans-free structured margarine fat

analogos with high stearate soybean oil and palm stearin and their characterization. *LWT—Food Science and Technology*, 50, 232-239.

Papantoniou, K., Fito, M., Covas, M.-I., Muñoz, D., & Schröder, H. (2010). Trans Fatty acid consumption, lifestyle and type 2 diabetes prevalence in a Spanish population. *Eur J Nutr*, 49(6), 357-364. <https://doi.org/10.1007/s00394-010-0093-z>.

Parcerisa, J., Codony, R., Boatella, J., & Rafecas, M. (1999). Fatty Acids Including *trans* Content of Commercial Bakery Products Manufactured in Spain. *J Agric Food Chem*, 47(5), 2040-2043. <https://doi.org/10.1021/jf980941j>.

Park, Y. (2009). Conjugated linoleic acid (CLA): Good or bad trans fat? *J Food Compost Anal*, 22, S4-S12. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2008.12.002>.

Park, C., & Maleky, F. (2020). A Critical Review of the Last 10 Years of Oleogels in Food. *Front Sustain Food Syst*, 4, 139. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.00139>.

Parodi PW. (2003). Conjugated linoleic acid in food. *Adv CLA Res*. 2, 101-122.

Passaloglou-Emmanouilidou, S. (1990). A comparative study of UV spectrophotometric methods for detection of olive oil adulteration by refined oils. *Zeitschrift Für Lebensmittel-Untersuchung Und -Forschung*, 191(2), 132-134. <https://doi.org/10.1007/BF01202639>.

Patel, A. R., Nicholson, R. A., & Marangoni, A. G. (2020). Applications of fat mimetics for the replacement of saturated and hydrogenated fat in food products. *Curr Opin Food Sci*, 33, 61-68. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.12.008>.

Pérez-Farinós, N., Dal Re Saavedra, M. Á., Villar Villalba, C., & Robledo de Dios, T. (2016). Trans-fatty acid content of food products in Spain in 2015. *Gac Sanit*, 30(5), 379-382. <https://doi.org/10.1016/j.gaceta.2016.04.007>.

Perú. Ministerio de Salud (2016). Decreto Supremo no, 033-2016-AS. Reglamento que

establece el proceso de reducción global hasta la eliminación, de las grasas *trans* en los alimentos y bebidas no alcohólicas procesados industrialmente. Ministerio de Salud. Lima.

Pfeuffer, M., & Schrezenmeir, J. (2006). Impact of trans fatty acids of ruminant origin compared with those from partially hydrogenated vegetable oils on CHD risk. *Int Dairy J*, 16(11), 1383-1388. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.06.016>.

Philippaerts, A., Jacobs, P. A., & Sels, B. F. (2013). Is there still a Future for Hydrogenated Vegetable Oils? *Angew Chem Int Ed*, 52(20), 5220-5226. <https://doi.org/10.1002/anie.201209731>.

PHO (Panamerican Health Organization) (2008). Healthy oils and the elimination of industrially produced trans fatty acids in the Americas: initiative for the prevention and control of chronic diseases. Panamerican Health Organization. Washington.

Pizzoferrato L, Leclercq C, Turrini A, van Erp-Baart MA, & Hulshof K. (1999). Levels of lipid and fatty acid ingestion in Italy: Results of the EC Transfair coordinated study. *Riv Ital Sci Aliment*, 28(3): 259-270.

Quilaqueo, M., Iturra, N., Contardo, I., Millao, S., Morales, E., & Rubilar, M. (2022). Food-Grade Bigels with Potential to Replace Saturated and Trans Fats in Cookies. *Gels*, 8(7), 445. <https://doi.org/10.3390/gels8070445>.

Rashid A, Amjad S, Nishtar MK, & Nishtar NA. (2020). Trans-Fatty Acid (TFA) elimination in Pakistan: A situational analysis. *J Pak Med Assoc*, 70 (Suppl 2) (5), S1-S30.

Rasmussen, R. S., Brattain, R. R., & Zucco, P. S. (1947). Infra-Red Absorption Spectra of Some Octenes. *J Chem Phys*, 15(3), 135-140. <https://doi.org/10.1063/1.1746443>.

Ratnayake, W. M. N., Gagnon, C., Dumais, L., Lillycrop, W., Wong, L., Meleta, M., & Calway, P. (2007). Trans Fatty Acid Content of Canadian Margarines Prior to Mandatory trans Fat Labelling. *J Am Oil Chem Soc*, 84(9), 817-825. <https://doi.org/10.1007/s11746-007-1112-y>.

Ratnayake, W. M., L'Abbe, M. R., Farnworth, S., Dumais, L., Gagnon, C., Lampi, B., Casey, V., Mohottalage, D., Rondeau, I., Underhill, L., Vigneault, M., Lillycrop, W., Meleta, M., Wong, L. Y., Ng, T., Gao, Y., Kwong, K., Chalouh, S., Pantazopoulos, P., Gunaratna, H., Lombaert, G. A. (2009a). Trans fatty acids: current contents in Canadian foods and estimated intake levels for the Canadian population. *JAOAC Int*, 92(5), 1258–1276.

Ratnayake, W. M. N., L'Abbe, M. R., & Mozaffarian, D. (2009b). Nationwide product reformulations to reduce trans fatty acids in Canada: When trans fat goes out, what goes in? *Eur J Clin Nutr*, 63(6), 808-811. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2008.39>.

Raulin J (1960). Nutritive value of lipids in relation to stereochemical configuration of fatty acids. *Annales de la Nutrition et de l'Alimentation*, 14, 201-211.

Remig, V., Franklin, B., Margolis, S., Kostas, G., Nece, T., & Street, J. C. (2010). Trans Fats in America: A Review of Their Use, Consumption, Health Implications, and Regulation. *J Am Diet Assoc*, 110(4), 585-592. <https://doi.org/10.1016/j.jada.2009.12.024>.

Requejo A, Ortega RM (2009). Nutriguía. *Editorial Complutense*. Madrid.

Restrepo, B. J., & Rieger, M. (2016). Trans fat and cardiovascular disease mortality: Evidence from bans in restaurants in New York. *J Health Econ*, 45, 176-196. <https://doi.org/10.1016/j.jhealeco.2015.09.005>.

Richter, E. K., Shawish, K. A., Scheeder, M. R. L., & Colombani, P. C. (2009). Trans fatty acid content of selected Swiss foods: The TransSwissPilot study. *J Food Compos Anal*, 22(5), 479-484. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2009.01.007>.

Rippin, H. L., Hutchinson, J., Ocke, M., Jewell, J., Breda, J. J., & Cade, J. E. (2017). An exploration of socio-economic and food characteristics of high trans fatty acid consumers in the Dutch and UK national surveys after voluntary product reformulation. *Food Nutr Res*, 61(1), 1412793. <https://doi.org/10.1080/16546628.2017.1412793>.

Risérus, U. (2008). Fatty acids and insulin sensitivity: *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 11(2), 100-105. <https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e3282f52708>.

Risérus, U., Arner, P., Brismar, K., & Vessby, B. (2002). Treatment With Dietary *trans* 10 *cis* 12 Conjugated Linoleic Acid Causes Isomer-Specific Insulin Resistance in Obese Men With the Metabolic Syndrome. *Diabetes Care*, 25(9), 1516-1521. <https://doi.org/10.2337/diacare.25.9.1516>.

Robledo de Dios, T., Dal Re Saavedra, MA., Villar Villalba C., & Pérez-Farinós N. (2015). Contenido de ácidos grasos trans en los alimentos en España. *Nutr Hosp*, 3, 1329-1333. <https://doi.org/10.3305/nh.2015.32.3.9410>.

Roe, M., Pinchen, H., Church, S., Elahi, S., Walker, M., Farron-Wilson, M., Buttriss, J., & Finglas, P. (2013). Trans fatty acids in a range of UK processed foods. *Food Chem*, 140(3), 427-431. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.08.067>.

Ros, E. (2015). Consenso sobre las grasas y aceites en la alimentación de la población. *Nutr Hosp*, 2, 435-477. <https://doi.org/10.3305/nh.2015.32.2.9202>.

Rubinstein, A., Elorriaga, N., Garay, O. U., Poggio, R., Caporale, J., Matta, M. G., Augustovski, F., Pichon-Riviere, A., & Mozaffarian, D. (2015). Eliminating artificial trans fatty acids in Argentina: Estimated effects on the burden of coronary heart disease and costs. *Bull World Health Organ.*, 93(9), 614-622. <https://doi.org/10.2471/BLT.14.150516>.

Salmerón, J., Hu, F. B., Manson, J. E., Stampfer, M. J., Colditz, G. A., Rimm, E. B., & Willett, W. C. (2001). Dietary fat intake and risk of type 2 diabetes in women. *Am J Clin Nutr*, 73(6), 1019-1026. <https://doi.org/10.1093/ajcn/73.6.1019>.

Samadi, A., Andreu, I., Ferreri, C., Dellonte, S., & Chatgililoglu, C. (2004). Thiyl radical-catalyzed isomerization of oils: An entry to the *trans* lipid library. *J Am Oil Chem Soc*, 81(8), 753-758. <https://doi.org/10.1007/s11746-004-0974-8>.

Sanders, T. A. B. (1988). Essential and *Trans* -Fatty Acids in Nutrition. *Nutr Res Rev*, 1(1), 57-78. <https://doi.org/10.1079/NRR19880007>.

Santos, L. A. T., Cruz, R., & Casal, S. (2015). Trans fatty acids in commercial cookies and biscuits: An update of Portuguese market. *Food Control*, 47, 141-146. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.06.046>.

Saravanan, N., Haseeb, A., Ehtesham, N. Z., & Ghafoorunissa. (2005). Differential effects of dietary saturated and trans-fatty acids on expression of genes associated with insulin sensitivity in rat adipose tissue. *Eur J Endocrinol*, 153(1), 159-165. <https://doi.org/10.1530/eje.1.01946>.

Satchithanandam, S., Oles, C. J., Spease, C. J., Brandt, M. M., Yurawecz, M. P., & Rader, J. I. (2004). Trans, saturated, and unsaturated fat in foods in the United States prior to mandatory trans-fat labeling. *Lipids*, 39(1), 11-18. <https://doi.org/10.1007/s11745-004-1195-5>.

Schwarz, W., Čmolík, J., & Pokorný, J. (1995). Isomerization of polyunsaturated fatty acids during the deodorization of edible oils. *Fett Wiss Technol*, 97, 491-495.

Sczaniecka, A. K., Brasky, T. M., Lampe, J. W., Patterson, R. E., & White, E. (2012). Dietary Intake of Specific Fatty Acids and Breast Cancer Risk Among Postmenopausal Women in the VITAL Cohort. *Nutr Cancer*, 64(8), 1131-1142. <https://doi.org/10.1080/01635581.2012.718033>.

Sherazi, S. T. H., Kandhro, A., Mahesar, S. A., Bhanger, M. I., Talpur, M. Y., & Arain, S. (2009). Application of transmission FT-IR spectroscopy for the trans fat determination in the industrially processed edible oils. *Food Chem*, 114(1), 323-327. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.058>.

Shingfield, K. J., Chilliard, Y., Toivonen, V., Kairenius, P., & Givens, D. I. (2008). Trans fatty acids and bioactive lipids in ruminant milk. *Adv Exp Med Biol*, 606, 3-65. https://doi.org/10.1007/978-0-387-74087-4_1.

Shokryazdan, P., Rajion, M. A., Meng, G. Y., Boo, L. J., Ebrahimi, M., Royan, M., Sahebi, M., Azizi, P., Abiri, R., & Jahromi, M. F. (2017). Conjugated linoleic acid: A potent fatty acid linked to animal and human health. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 57(13), 2737-2748. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1060190>.

Shreve, O. D., Heether, M. R., Knight, H. B., & Swern, Daniel. (1950). Determination of *trans*-Octadecenoic Acids, Esters, and Alcohols in Mixtures. *Anal Chem*, 22(10), 1261-1264. <https://doi.org/10.1021/ac60046a008>.

Silva, T. J., Barrera-Arellano, D., & Ribeiro, A. P. B. (2021). Margarines: Historical approach, technological aspects, nutritional profile, and global trends. *Food Res Int*, 147, 110486. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110486>.

Skeaff, C. M. (2009). Feasibility of recommending certain replacement or alternative fats. *Eur J Clin Nutr*, 63(S2), S34-S49. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602974>.

Smith PR (2005). Healthy high-quality fats from a food science perspective. *Lipid Technol*, 17(8): 177-181.

Spaaij, C. J. K., & Pijls, L. T. J. (2004). New dietary reference intakes in the Netherlands for energy, proteins, fats and digestible carbohydrates. *Eur J Clin Nutr*, 58(1), 191-194. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1601788>.

Steinhart H, Pfalzgraf A (1995). Consumption and metabolism of dietary *trans* fatty acids. *Eur J Med Res*, 1(2):84-85.

Stender, S. (2019). Industrially produced *trans* fat in popular foods in 15 countries of the former Soviet Union from 2015 to 2016: A market basket investigation. *BMJ Open*, 9(2), e023184. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2018-023184>.

Stender, S. (2020). *Trans* fat in foods in Iran, South-Eastern Europe, Caucasia and Central Asia: A market basket investigation. *Food Policy*, 96, 101877.

<https://doi.org/10.1016/j.foodpol.2020.101877>.

Stender, S., Astrup, A., & Dyerberg, J. (2012). A trans European Union difference in the decline in *trans* fatty acids in popular foods: A market basket investigation. *BMJ Open*, 2(5), e000859. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2012-000859>.

Stender, S., Astrup, A., & Dyerberg, J. (2016). Artificial *trans* fat in popular foods in 2012 and in 2014: A market basket investigation in six European countries. *BMJ Open*, 6(3), e010673. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2015-010673>.

Stender, S., & Dyerberg, J. (2004). Influence of Trans Fatty Acids on Health. *Ann Nutr Metab*, 48(2), 61-66. <https://doi.org/10.1159/000075591>.

Stender, S., Dyerberg, J., & Astrup, A. (2006). High Levels of Industrially Produced Trans Fat in Popular Fast Foods. *N Engl J Med*, 354(15), 1650-1652. <https://doi.org/10.1056/NEJMc052959>.

Stepien, M., Chajes, V., & Romieu, I. (2016). The role of diet in cancer: The epidemiologic link. *Salud Publica Mex*, 58(2), 261-273. <https://doi.org/10.21149/spm.v58i2.7795>.

Sterne, J. A. C., & Egger, M. (2001). Funnel plots for detecting bias in meta-analysis. *J Clin Epidemiol*, 54(10), 1046-1055. [https://doi.org/10.1016/S0895-4356\(01\)00377-8](https://doi.org/10.1016/S0895-4356(01)00377-8).

Strocchi, A., & Marascio, G. (1992). Composizione acidica e trans insaturazione dei lipidi alimentari. Nota I: Prodotti ad alto contenuto lipidico. *Riv It Scienza Alimentazione*, 21(1), 57-64.

Sutton, A. J., & Higgins, J. P. T. (2008). Recent developments in meta-analysis. *Stat Med*, 27(5), 625-650. <https://doi.org/10.1002/sim.2934>.

Swern, D., Knight, H. B., Shreve, O. D., & Heether, M. R. (1950). Comparison of infrared spectrophotometric and lead salt-alcohol methods for determination of trans octadecenoic acids

and esters. *J Am Oil Chem Soc*, 27(1), 17-21. <https://doi.org/10.1007/BF02634892>.

Takata, Y., King, I. B., Neuhouser, M. L., Schaffer, S., Barnett, M., Thornquist, M., Peters, U., & Goodman, G. E. (2009). Association of serum phospholipid fatty acids with breast cancer risk among postmenopausal cigarette smokers. *Cancer Causes & Control*, 20(4), 497-504. <https://doi.org/10.1007/s10552-009-9314-2>.

Takeuchi, H., & Sugano, M. (2017). Industrial *Trans* Fatty Acid and Serum Cholesterol: The Allowable Dietary Level. *J Lipids*, 1-10. <https://doi.org/10.1155/2017/9751756>.

Tan, A. S. L. (2009). A case study of the New York City trans-fat story for international application. *J Public Health Policy*, 30(1), 3-16. <https://doi.org/10.1057/jphp.2008.42>.

Tao, Y., Li, J., Lo, Y. M., Tang, Q., & Wang, Y. (2011). Food nutrition labelling practice in China. *Public Health Nutr*, 14(03), 542-550. <https://doi.org/10.1017/S1368980010002065>.

Tarar, O. M., Ahmed, K. M., Nishtar, N. A., Achakzai, A. B. K., Gulzar, Y., Delles, C., & Al-Jawaldeh, A. (2020). Understanding the complexities of prevalence of trans fat and its control in food supply in Pakistan. *J Clin Hypertens*, 22(8), 1338-1346. <https://doi.org/10.1111/jch.13943>.

Tarrago-Trani, M. T., Phillips, K. M., Lemar, L. E., & Holden, J. M. (2006). New and Existing Oils and Fats Used in Products with Reduced Trans-Fatty Acid Content. *J Am Diet Assoc*, 106(6), 867-880. <https://doi.org/10.1016/j.jada.2006.03.010>.

Tasan, M., & Demirci, M. (2003). *Trans* FA in sunflower oil at different steps of refining. *J Am Oil Chem Soc*, 80(8), 825-828. <https://doi.org/10.1007/s11746-003-0779-9>.

Tasan, M., Gecgel, U., & Demirci, M. (2011). Comparison of geometrical isomerization of unsaturated fatty acids in selected commercially refined oils. *Grasas y Aceites*, 62(3), 284-289. <https://doi.org/10.3989/gya.102310>.

- Te Morenga, L., & Montez, J. M. (2017). Health effects of saturated and trans-fatty acid intake in children and adolescents: Systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE*, *12*(11), e0186672. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186672>.
- Trattner, S., Becker, W., Wretling, S., Öhrvik, V., & Mattisson, I. (2015). Fatty acid composition of Swedish bakery products, with emphasis on trans-fatty acids. *Food Chem*, *175*, 423-430. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.145>.
- Tyburczy, C., Delmonte, P., Fardin-Kia, A. R., Mossoba, M. M., Kramer, J. K. G., & Rader, J. I. (2012). Profile of *trans* Fatty Acids (FAs) Including *Trans* Polyunsaturated FAs in Representative Fast Food Samples. *J Agric Food Chem*, *60*(18), 4567-4577. <https://doi.org/10.1021/jf300585s>.
- Tzeng, Y.-Z., & Hu, C.-H. (2014). Radical-Induced *Cis-Trans* Isomerization of Fatty Acids: A Theoretical Study. *J Phys Chem A*, *118*(25), 4554-4564. <https://doi.org/10.1021/jp502434t>.
- Uauy R (2007). Las Américas libres de grasa trans. *Nutrición*, *21*, 30-33.
- Uauy, R., Aro, A., Clarke, R., Ghafoorunissa, L'Abbé, M. R., Mozaffarian, D., Skeaff, C. M., Stender, S., & Tavella, M. (2009). WHO Scientific Update on trans fatty acids: Summary and conclusions. *Eur J Clin Nutr*, *63*(S2), S68-S75. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2009.15>.
- Ulberth, F., & Henninger, M. (1992). Simplified method for the determination of trans monoenes in edible fats by TLC-GLC. *J Am Oil Chem Soc*, *69*(8), 829-831. <https://doi.org/10.1007/BF02635926>.
- Unión Europea (2006). Reglamento (CE) No. 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 20 de diciembre de 2006, relativo a las declaraciones nutricionales y de las propiedades saludables en los alimentos. *DOCE L 404*, 9-25.
- Unión Europea (2011). Regulación (EU) No. 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo, del 25 de octubre del 2011. *JOCE 304*, 18-63.

Unnevehr, L. J., & Jagmanaitė, E. (2008). Getting rid of trans fats in the US diet: Policies, incentives and progress. *Food Policy*, 33(6), 497-503. <https://doi.org/10.1016/j.foodpol.2008.05.006>.

Urrutia, G., & Bonfill, X. (2010). Declaración PRISMA: Una propuesta para mejorar la publicación de revisiones sistemáticas y metaanálisis. *Med Clin*, 135(11), 507-511. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2010.01.015>.

Valenzuela, A., & Morgado, N. (1999). Trans fatty acid isomers in human health and in the food industry. *Biol Res*, 32(4). <https://doi.org/10.4067/S0716-9760eur000400007>.

van Alphen J (1964). De Chevreul à Mège-Mouriès: Histoire du terme «margarine». *Oléagineux*, 19, 525-528.

van Duijn, G. (2005). Technical aspects of trans reduction in modified fats. *Oléagineux, Corps gras, Lipides*, 12(5-6), 422-426. <https://doi.org/10.1051/ocl.2005.0422>.

van Poppel, G., van Erp-Baart, M.-A., Leth, T., Gevers, E., Van Amelsvoort, J., Lanzmann-Petithory, D., Kafatos, A., & Aro, A. (1998). Trans Fatty Acids in Foods in Europe: The TRANSFAIR Study. *J Food Compost Anal*, 11(2), 112-136. <https://doi.org/10.1006/jfca.1998.0568>.

Vanden Heuvel, J. P. (2004). Diet, fatty acids, and regulation of genes important for heart disease. *Curr Atheroscler Rep*, 6(6), 432-440. <https://doi.org/10.1007/s11883-004-0083-9>.

Varela Moreiras G. (coord) (2006). Evaluación del consumo de alimentos enriquecidos/fortificados en España, a través del Panel de Consumo Alimentario. *Fundación Española de la Nutrición (FEN)*. Madrid.

Vicario, I. M., Griguol, V., & León-Camacho, M. (2003). Multivariate Characterization of the Fatty Acid Profile of Spanish Cookies and Bakery Products. *J Agric Food Chem*, 51(1), 134-139. <https://doi.org/10.1021/jf0258297>.

von Houwelingen, A. C., & Hornstra, G. (1994). Trans fatty acids in early human development. *World Rev Nutr Diet*, 75, 175–178. <https://doi.org/10.1159/000423577>.

Vučić, V., Arsić, A., Petrović, S., Milanović, S., Gurinović, M., & Glibetić, M. (2015). Trans fatty acid content in Serbian margarines: Urgent need for legislative changes and consumer information. *Food Chem*, 185, 437-440. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.018>.

Yılmaz, B., & Ağagündüz, D. (2022). Fractionated palm oils: Emerging roles in the food industry and possible cardiovascular effects. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 62(7), 1990-1998. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1869694>.

Wagner, K.-H., Auer, E., & Elmadfa, I. (2000). Content of trans fatty acids in margarines, plant oils, fried products and chocolate spreads in Austria. *Eur Food Res Technol*, 210(4), 237-241. <https://doi.org/10.1007/s002179900080>.

Wagner, K.-H., Plasser, E., Proell, C., & Kanzler, S. (2008). Comprehensive studies on the trans fatty acid content of Austrian foods: Convenience products, fast food and fats. *Food Chem*, 108(3), 1054-1060. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.11.038/>.

Wahle, K. W. J., Heys, S. D., & Rotondo, D. (2004). Conjugated linoleic acids: Are they beneficial or detrimental to health? *Prog Lipid Res*, 43(6), 553-587. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2004.08.002>.

Walker, E. B., Davies, D. R., & Campbell, M. (2007). Quantitative Measurement of Trans-Fats by Infrared Spectroscopy. *J Chem Educ*, 84(7), 1162. <https://doi.org/10.1021/ed084p1162>.

Wallis, J. G., Bengtsson, J. D., & Browse, J. (2022). Molecular Approaches Reduce Saturates and Eliminate trans Fats in Food Oils. *Front Plant Sci*, 13, 908608. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.908608>.

Wanders, A., Zock, P., & Brouwer, I. (2017). Trans Fat Intake and Its Dietary Sources in General Populations Worldwide: A Systematic Review. *Nutrients*, 9(8), 840.

<https://doi.org/10.3390/nu9080840>.

Wang, J., John, E. M., Horn-Ross, P. L., & Ingles, S. A. (2008). Dietary Fat, Cooking Fat, and Breast Cancer Risk in a Multiethnic Population. *Nutr Cancer*, 60(4), 492-504. <https://doi.org/10.1080/01635580801956485>.

Wang, Q., Afshin, A., Yakoob, M. Y., Singh, G. M., Rehm, C. D., Khatibzadeh, S., Micha, R., Shi, P., Mozaffarian, D., & Global Burden of Diseases Nutrition and Chronic Diseases Expert Group (NutriCoDE) (2016). Impact of Nonoptimal Intakes of Saturated, Polyunsaturated, and Trans Fat on Global Burdens of Coronary Heart Disease. *J Am Heart Assoc*, 5(1), e002891. <https://doi.org/10.1161/JAHA.115.002891>.

Weggemans, R. M., Rudrum, M., & Trautwein, E. A. (2004). Intake of ruminant versus industrial *trans* fatty acids and risk of coronary heart disease – what is the evidence? *Eur J Lipid Sci Technol*, 106(6), 390-397. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200300932>.

Whigham, L. D., Watras, A. C., & Schoeller, D. A. (2007). Efficacy of conjugated linoleic acid for reducing fat mass: A meta-analysis in humans. *Am J Clin Nutr*, 85(5), 1203-1211. <https://doi.org/10.1093/ajcn/85.5.1203>.

Wilczek, M. M., Olszewski, R., & Krupienicz, A. (2017). *Trans*-Fatty Acids and Cardiovascular Disease: Urgent Need for Legislation. *Cardiology*, 138(4), 254-258. <https://doi.org/10.1159/000479956>.

Wilkening V (2001). Proposed changes in USA regulations for food labelling. *J Food Comp Anal*, 14(3), 3309-314.

Willett, W. (1993). Intake of trans fatty acids and risk of coronary heart disease among women. *The Lancet*, 341(8845), 581-585. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(93\)90350-P](https://doi.org/10.1016/0140-6736(93)90350-P).

Willett, W., & Mozaffarian, D. (2008). Ruminant or industrial sources of trans fatty acids: Public health issue or food label skirmish? *Am J Clin Nutr*, 87(3), 515-516.

<https://doi.org/10.1093/ajcn/87.3.515>.

Woollett LA, Daumerie CM, & Dietschy JM (1994). Trans-9-octadecenoic acid is biologically neutral and does not regulate the low-density lipoprotein receptor as the cis isomer does in the hamster. *J Lipid Res*, 35(9), 1661-1673.

Yamada, M., Sasaki, S., Murakami, K., Takahashi, Y., Okubo, H., Hirota, N., Notsu, A., Todoriki, H., Miura, A., Fukui, M., & Date, C. (2010). Estimation of Trans Fatty Acid Intake in Japanese Adults Using 16-Day Diet Records Based on a Food Composition Database Developed for the Japanese Population. *J Epidemiol*, 20(2), 119-127. <https://doi.org/10.2188/jea.JE20090080>.

Yu X, Du S, Yue T, Li Z (2008). Trans fatty acid determination of edible oils by attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy. *Zhongguo Liangyou Xuebao*, 23, 189-193.

Zambonin, L., Ferreri, C., Cabrini, L., Prata, C., Chatgililoglu, C., & Landi, L. (2006). Occurrence of trans fatty acids in rats fed a trans-free diet: A free radical-mediated formation? *Free Radic Biol Med*, 40(9), 1549-1556. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.12.021>.

Żbikowska, A. (2010). Formation and properties of trans fatty acids – a review. *Pol J Food Nutr Sci*, 60(2), 107-114.

Zhang, H., Smith, P., & Adler-Nissen, J. (2004). Effects of Degree of Enzymatic Interesterification on the Physical Properties of Margarine Fats: Solid Fat Content, Crystallization Behavior, Crystal Morphology, and Crystal Network. *J Agric Food Chem*, 52(14), 4423-4431. <https://doi.org/10.1021/jf035022u>.

Zhang, Y., Zhuang, P., Wu, F., He, W., Mao, L., Jia, W., Zhang, Y., Chen, X., & Jiao, J. (2021). Cooking oil/fat consumption and deaths from cardiometabolic diseases and other causes: Prospective analysis of 521,120 individuals. *BMC Med*, 19(1), 92. <https://doi.org/10.1186/s12916-021-01961-2>.

Zhou, B., Stamler, J., Dennis, B., Moag-Stahlberg, A., Okuda, N., Robertson, C., Zhao, L., Chan, Q., Elliott, P., & for the INTERMAP Research Group. (2003). Nutrient intakes of middle-aged men and women in China, Japan, United Kingdom, and United States in the late 1990s: The INTERMAP Study. *J Hum Hypertens*, 17(9), 623-630. <https://doi.org/10.1038/sj.jhh.1001605>.

Zhu, Y., Bo, Y., & Liu, Y. (2019). Dietary total fat, fatty acids intake, and risk of cardiovascular disease: A dose-response meta-analysis of cohort studies. *Lipids Health Dis*, 18(1), 91. <https://doi.org/10.1186/s12944-019-1035-2>.

Zupanič, N., Hribar, M., Pivk Kupirovič, U., Kušar, A., Žmitek, K., & Pravst, I. (2018). Limiting trans Fats in Foods: Use of Partially Hydrogenated Vegetable Oils in Prepacked Foods in Slovenia. *Nutrients*, 10(3), 355. <https://doi.org/10.3390/nu10030355>.

