

R. 6625

T-476

DEPARTAMENTO DE QUIMICA ORGANICA Y FARMACEUTICA

EVALUACION ANALITICA Y NUTRICIONAL DE GRASAS
COMESTIBLES TERMOXIDADAS

Autor

Gloria Márquez

Gloria Márquez Ruiz
Lda. en Farmacia

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
SECRETARIA GENERAL



Queda registrada esta Tesis Doctoral
al folio 138 número 79 del libro
correspondiente.

Sevilla, 01 MAR. 1989

El Jefe del Negociado de Tesis,

Flora Caffette

Director

H. E. Dobarganes

Dra. M^a Carmen Dobarganes García
Investigador Científico C.S.I.C.

Catedrático Tutor

Juan Galbis

Dr. Juan Galbis Pérez
Catedrático de Química Orgánica
y Farmacéutica.

INDICE

1.- INTRODUCCION	1
1.1.- IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DE GRASAS TERMOXIDADAS	4
1.2.- MODIFICACIONES QUIMICAS PRODUCIDAS EN LA TERMOXIDACION DE ACEITES Y GRASAS	12
1.2.1.- Alteraciones térmicas	14
1.2.2.- Alteraciones oxidativas	20
1.2.3.- Compuestos específicos originados en grasas comestibles termoxidadas	30
1.2.4.- Evaluación analítica de la alteración	34
1.2.4.1.- Indices analíticos	36
1.2.4.2.- Cuantificación de la alteración	38
1.2.4.3.- Sistemáticas analíticas para la evaluación de compuestos originados en la termoxidación de las grasas	43
1.3.- CONSECUENCIAS DE LA INGESTION DE GRASAS TERMOXIDADAS	45
1.3.1.- Características generales de los estudios	47
1.3.2.- Toxicidad potencial de las grasas termoxidadas	51
1.3.2.1.- Grasas oxidadas a temperaturas poco elevadas	53
1.3.2.2.- Grasas sometidas a oxidación forzada a elevada temperatura	54
1.3.2.3.- Grasas alteradas térmicamente en ausencia de oxígeno	54
1.3.2.4.- Grasas termoxidadas en ausencia de alimento	56
1.3.2.5.- Grasas de fritura	58
1.3.3.- Absorción y digestibilidad de grasas termoxidadas	60
1.3.3.1.- Evaluación directa	62
1.3.3.2.- Evaluación de lípidos no absorbidos	66
1.4.- OBJETIVOS DEL TRABAJO	72

2.- PARTE EXPERIMENTAL	75
2.1.- DESARROLLO DE METODOS ANALITICOS PARA LA CUANTIFICACION DE LA ALTERACION EN GRASAS TERMOXIDADAS	76
2.1.1.- Determinación de compuestos de alteración glicerídicos	79
2.1.1.1.- Muestras	82
2.1.1.2.- Ensayos previos: selección de condiciones cromatográficas	85
2.1.1.3.- Procedimiento analítico	91
2.1.2.- Determinación de ácidos monómeros, dímeros y polímeros	103
2.1.2.1.- Muestras	108
2.1.2.2.- Ensayos previos	109
2.1.2.3.- Procedimiento analítico	115
2.2.- EVALUACION DE LAS TASAS DE ABSORCION DE LOS COMPUESTOS ORIGINADOS EN LA TERMOXIDACION DE GRASAS	120
2.2.1.- Metodología general	123
2.2.1.1.- Características generales de las experiencias con animales	124
2.2.1.2.- Métodos analíticos	126
2.2.2.- Experiencia inicial: puesta a punto de las técnicas analíticas y selección de variables en los ensayos nutricionales	134
2.2.2.1.- Planteamiento de la experiencia	137
2.2.2.2.- Reproducibilidad de las técnicas analíticas previas al análisis de lípidos no absorbidos	139
2.2.2.3.- Análisis de los lípidos no absorbidos	144
2.2.2.4.- Selección de variables en los ensayos nutricionales	150
2.2.3.- Experiencia principal: determinación cuantitativa de lípidos no absorbidos	156
2.2.3.1.- Planteamiento de la experiencia	158

2.2.3.2.- Caracterización de lípidos de origen endógeno	161
2.2.3.3.- Cuantificación de compuestos no absorbidos	169
2.2.3.3.1.- Lípidos totales	169
2.2.3.3.2.- Fracción insaponificable	176
2.2.3.3.3.- Ácidos grasos no alterados	178
2.2.3.3.4.- Ácidos oxidados monómeros	180
2.2.3.3.5.- Ácidos dímeros térmicos	182
2.2.3.3.6.- Ácidos dímeros oxidados	182
2.2.3.3.7.- Ácidos polímeros	184
2.3.- ESTUDIOS ESPECIFICOS	187
2.3.1.- Interacción entre la grasa de la dieta y los lípidos de origen endógeno	190
2.3.1.1.- Cuantificación de esteroides de origen endógeno	193
2.3.1.2.- Cuantificación de ácidos no polares de origen endógeno	201
2.3.2.- Diferenciación entre las etapas de hidrólisis enzimática y absorción	205
2.3.2.1.- Hidrólisis enzimática "in vitro" de grasas termoxidadas	208
2.3.2.2.- Determinación de ácidos libres y esterificados en lípidos no absorbidos	219
2.3.3.- Absorción de moléculas poliméricas de ácido [1- ¹⁴C]-linoleico	232
3.- RESUMEN Y CONCLUSIONES GENERALES	255
4.- BIBLIOGRAFIA	259

ABREVIATURAS

TG	Triglicéridos
TG ox	Triglicéridos oxidados
D TG	Dímeros de triglicéridos
T TG	Trímeros de triglicéridos
P TG	Polímeros de triglicéridos
DG	Diglicéridos
MG	Monoglicéridos
AG	Ácidos grasos
AG ox	Ácidos grasos oxidados
D AG	Dímeros de ácidos grasos
Dn.p. AG	Dímeros no polares de ácidos grasos
Dp. AG	Dímeros polares de ácidos grasos
P AG	Polímeros de ácidos grasos
EM	Esteres metílicos

1.- INTRODUCCION

La alteración termoxidativa es el resultado de la acción conjunta de 2 variables - temperatura y oxígeno - que originan modificaciones profundas en la estructura de la grasa.

Consideradas independientemente, la acción del oxígeno a baja temperatura desencadena el conocido mecanismo de autooxidación que, a través de la formación de radicales libres, da lugar a una variada gama de compuestos de muy distinta polaridad y peso molecular, mientras que los principales compuestos originados como consecuencia de una elevada temperatura en ausencia de oxígeno son dímeros y polímeros de triglicéridos de polaridad media o baja. En ambos casos, las modificaciones tienen lugar en los restos acilo insaturados constituyentes de los triglicéridos y sólo a muy elevadas temperaturas son apreciables las reacciones termolíticas que involucran al enlace ester de la molécula (1).

Aunque desde un punto de vista cualitativo se han identificado un elevado número de compuestos en ambas situaciones, es necesario un tiempo elevado de reacción para obtener cantidades significativas de los mismos. Sin embargo, en condiciones de oxidación a elevada temperatura, no sólo se observa un drástico efecto sinergista, al aumentar la cantidad de los compuestos característicos de la acción de ambas variables para un mismo tiempo de reacción, sino que, además, la inestabilidad térmica de los radicales iniciales de la cadena autooxidativa origina nuevas posibilidades de reacción y, en consecuencia, la formación de muy distintos grupos de compuestos, de difícil cuantificación (2-4).

Teniendo en cuenta estos hechos, no es extraño que, cuando tales circunstancias afectan a aceites o grasas comestibles que son ingeridas después de sufrir esta amplia serie de modificaciones, exista interés general por conocer los niveles de alteración que se originan en las distintas formas de utilización de las grasas y una preocupación por establecer las consecuencias fisiológicas de su ingestión (5),(6).

Con este trabajo se pretende contribuir a una mejor evaluación química y nutricional de los principales grupos de compuestos originados durante la termoxidación de los aceites y grasas comestibles.

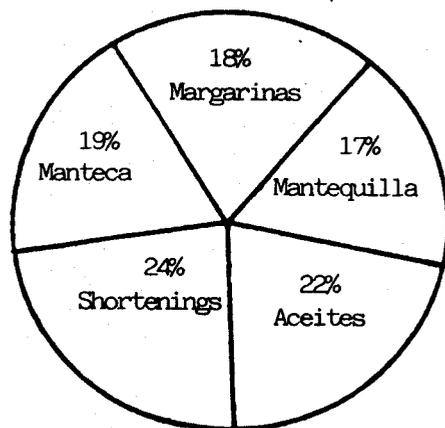
**1.1.- IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DE GRASAS
TERMOXIDADAS**

Aunque el calentamiento de las grasas en presencia de aire es común a muchas fases de su proceso de obtención y de los procedimientos de preparación de los alimentos, el interés en el estudio de la alteración termoxidativa está fundamentalmente relacionado con el proceso de fritura.

La principal razón es, sin duda, la expansión del procedimiento a los países industrializados debido a la necesidad de preparación rápida de los alimentos y al desarrollo de los sistemas de alimentación colectiva, que encuentran solución en el excelente medio de transferencia de calor que proporciona la grasa. La consecuencia ha sido un enorme incremento en las cantidades de grasa consumidas en el proceso de fritura, el cambio en su forma de realización y la incorporación de tecnología al proceso dirigido a la fabricación de nuevos productos de alto valor añadido (7).

La importancia actual del sector se muestra en la Figura 1, donde se recoge el cambio en el consumo de grasas en sus utilidades más representativas. En ella puede observarse que la producción de grasas y aceites se ha duplicado en los últimos 25 años y que ese incremento ha sido superior al experimentado por la población, de lo que se deduce que el consumo de grasas per cápita aumenta, a pesar de las recomendaciones existentes para disminuir su participación en la dieta (8).

1960
29 millones de T



1985
63 millones de T

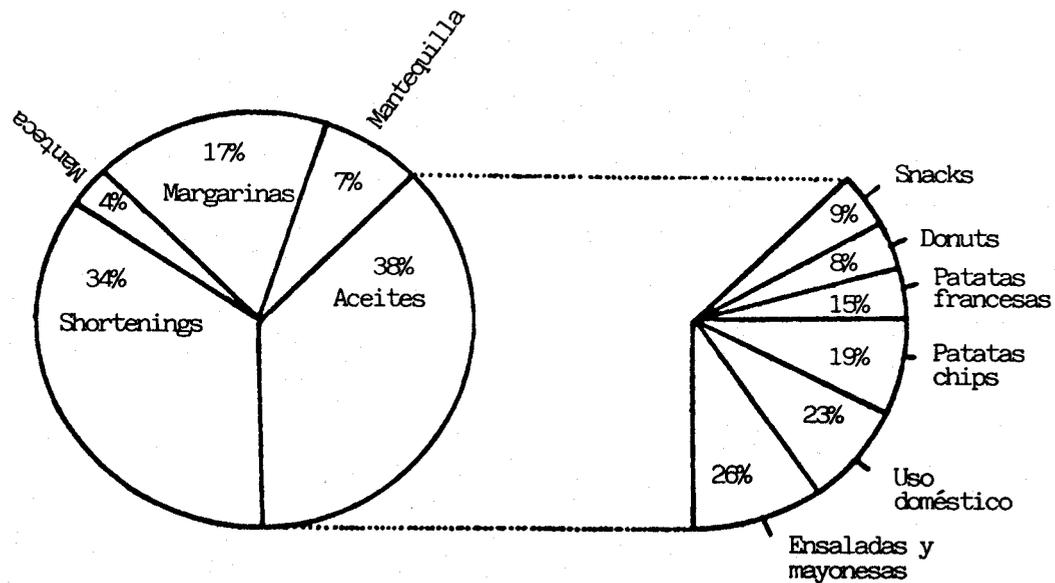


Figura 1.- Cambios en el consumo de grasas desde 1960 a 1985

Los hechos más significativos son, por una parte, la gran disminución experimentada por las grasas animales y mantequillas, clara influencia de su asociación con el mayor riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares y, paralelamente, el incremento experimentado por las grasas plásticas, que, por sus características de elevada estabilidad, son utilizadas en la preparación de alimentos a elevada temperatura, fundamentalmente fritos y horneados.

En lo que se refiere al sector de aceites, su distribución en diferentes aplicaciones muestra que la cuarta parte es consumido en fresco y el resto, fundamentalmente, en la fabricación industrial de productos fritos.

Si consideramos conjuntamente los aceites y grasas plásticas, es fácilmente deducible que, en la actualidad, la mayor parte de las grasas comestibles se consumen después de haber sido sometidas a elevadas temperaturas.

De forma más específica, la Tabla I muestra la importancia en EE.UU. del sector de alimentos de consumo inmediato, que es el más directamente relacionado con el incremento en el consumo de grasas sometidas previamente a elevada temperatura. Como puede observarse, su crecimiento en los últimos años es muy superior al experimentado por el sector de alimentos y bebidas considerado globalmente. Por otra parte, la mayor cantidad de grasa consumida corresponde al subsector de alimentos de rápida preparación (fast foods), claramente dominado por multinacionales y en el que sólo las 3 cadenas más importantes - Mc Donald, Burger King y Kentucky Fried Chicken - tuvieron en 1987 unas ventas cercanas a los 20.000 millones de dólares (9).

Si la expansión a los países industrializados ha sido fundamental para el incremento de estudios en torno a la alteración que experimentan las grasas en tales condiciones, el cambio en la forma en que se realiza el proceso, tanto desde el punto de vista industrial como doméstico, ha sido determinante en el interés por controlar la alte-

Tabla I.- Características del sector de alimentos para consumo inmediato en 1986.

VENTAS	-----	≈ 200.000 millones \$ (=4,6% PNB)
GRASAS Y ACEITES CONSUMIDOS	-----	20% de la producción total
ACEITES Y GRASAS PLASTICAS PARA FRITURA	-----	12% de la producción total
CRECIMIENTO SECTOR ALIMENTOS Y BEBIDAS RESPECTO A 1985	-----	4,8%
CRECIMIENTO SECTOR CONSUMO INMEDIATO RESPECTO A 1985	-----	6,6%
CRECIMIENTO SECTOR CONSUMO INMEDIATO PREVISTO PARA 1987	-----	7,2%

ración de la grasa. En efecto, la fritura tradicionalmente utilizada para la preparación de alimentos en los países del Mediterráneo y asociada con la disponibilidad de aceite de oliva, se realizaba calentando una pequeña cantidad de aceite, en relación con la cantidad de producto frito, lo que implicaba una elevada velocidad de reposición con aceite no calentado y la imposibilidad de alcanzar niveles de alteración elevados.

En la actualidad, sin embargo, la situación se ha invertido. Se utiliza una gran cantidad de grasa para una relativamente pequeña cantidad de producto a freír y, por tanto, la grasa es utilizada un elevado número de veces con una mínima velocidad de reposición, alcanzando la alteración niveles muy elevados que llegan en ocasiones hasta el 50% de triglicéridos alterados. La consecuencia fundamental es que la grasa se convierte así en el único alimento que, conociendo el consumidor que se degrada cada vez más, se sigue consumiendo sin un control adecuado.

En resumen, la situación actual se caracteriza por un increíble aumento del consumo de grasas termoxidadas que, además, tienen mayores posibilidades de alteración debido al cambio de las características del proceso. Esta situación justifica sobradamente el incremento de los estudios dirigidos a muy diferentes aspectos según los intereses implicados. Así, desde el punto de vista industrial se plantea, fundamentalmente la necesidad de definir las grasas más estables y los procedimientos para alargar el tiempo de uso de las mismas, con el objetivo de disminuir el volumen de grasas desechadas que se cifra, en la actualidad, en un 30% (10). Para los consumidores y Administración Pública, sin embargo, el objetivo es garantizar la salubridad de los productos fritos y establecer limitaciones objetivas a la alteración de la grasa.

Finalmente, es necesario destacar que la fritura, como procedimiento aplicado a los alimentos, es un proceso aún en expansión. Las causas fundamentales que apoyan esta generalizada opinión en el momento actual, se resumen a continuación:

1.- La extensión del procedimiento a utilizaciones no clásicas.

Destaca así su inclusión en las fases del proceso de fabricación de alimentos cárnicos que requieren alta temperatura y corto tiempo (tratamiento H.T.S.T.), o su contribución al desarrollo de una extensa gama de nuevos productos que son comercializados prefritos y congelados (11) (12).

2.- El interés por el desarrollo de nuevas variedades de semillas, obtenidas por mutación natural o dirigida, que permitan aumentar la disponibilidad de aceites vegetales de insaturación media o baja.

La comercialización de variedades de cártamo y girasol de alto contenido en oleico demuestran que la principal diferencia con las variedades clásicas se encuentra en la composición en ácidos grasos del aceite y, por ello, su aplicación más apreciada es su utilización a elevada temperatura como grasa de mayor estabilidad, que permita disminuir, a largo plazo, el consumo de grasas parcialmente hidrogenadas (13) (14).

3.- La carrera establecida para conseguir la aprobación de nuevos productos grasos de bajo contenido calórico.

Aunque desde hace 20 años se utilizan formulaciones para reemplazar parte de la grasa en alimentos no calentados, el interés actual de importantes multinacionales está en la preparación de productos de propiedades funcionales y estructurales similares a las grasas clásicas, que puedan utilizarse en la preparación de alimentos a elevada temperatura (15) (16). La característica común de estos productos es su baja o nula digestibilidad, lo que significa hacer compatibles la rapidez de preparación y apetitosidad de los productos fritos con las ventajas de un moderado consumo de calorías en la dieta. La importancia futura de estos productos puede ser tal, que prestigiosas

empresas de prospectiva prevén para las próximas dos décadas hasta una participación del 16% en el mercado total de grasas (17). Entre estos productos grasos merecen especial atención los poliésteres de sacarosa (18-20), cuya comercialización para utilizar en mezclas con grasas clásicas se prevé en un corto periodo de tiempo.

La entrada en el mercado de estos productos abrirá, sin duda, una importante línea de estudios sobre las modificaciones que se originan en los mismos y su velocidad relativa de alteración en relación con las grasas clásicas, ya que está bien establecido que la degradación de los ácidos grasos depende, en gran parte, de la molécula en que se encuentran esterificados.

Una consideración objetiva de las circunstancias referidas, justifican el interés actual del estudio de la alteración termooxidativa y explican la necesidad de definir las propiedades fisiológicas de los compuestos originados.

**1.2.- MODIFICACIONES QUIMICAS PRODUCIDAS EN LA
TERMOXIDACION DE ACEITES Y GRASAS**

Las modificaciones originadas en la grasa como consecuencia de la temperatura y del oxígeno atmosférico tienen lugar prioritariamente, como se ha comentado, en los restos acilo insaturados constituyentes de las moléculas de triglicérido. Dada la diversidad de ácidos grasos presentes en una grasa, sus posibilidades de combinación y las dificultades para obtener conclusiones a partir de sistemas complejos, la mayor parte de la información más rigurosa sobre la acción de ambas variables, se ha obtenido utilizando moléculas más simples como los ácidos grasos puros o sus ésteres metílicos, en condiciones de alteración muy bien definidas. El uso de tales sistemas modelo ha supuesto y supone aún una importante contribución al mejor conocimiento de los compuestos de oxidación producidos a elevada temperatura y al desarrollo de métodos analíticos de posterior aplicación a grasas comestibles.

En este apartado se recoge la información bibliográfica sobre los compuestos formados en condiciones de alteración térmica en ausencia de oxígeno, y de oxidación a baja y alta temperatura, resumiéndose posteriormente las características específicas de las grasas comestibles termoxidadas y los métodos analíticos que se han desarrollado para la evaluación de las mismas.

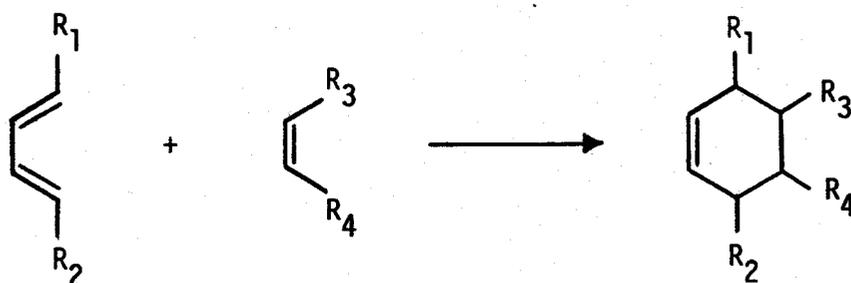
1.2.1.- Alteraciones térmicas

Tres grupos de reacciones destacan en la grasa, como consecuencia de la acción de una elevada temperatura en ausencia de oxígeno:

- a) Uniones entre cadenas insaturadas de ácidos grasos que dan lugar a compuestos de polimerización.
- b) Reestructuración intramolecular con formación de monómeros cíclicos.
- c) Descomposición termolítica del triglicérido con formación de ácidos grasos, aldehidos y cetonas.

a) Formación de dímeros y polímeros

Los principales compuestos obtenidos en la alteración térmica son compuestos dímeros en cuya unión no participa el oxígeno, y cuya formación se explica a través de reacciones Diels-Alder; es decir, reacciones entre un doble enlace y un dieno conjugado para formar un derivado ciclohexénico tetrasustituído:



Las reacciones de polimerización que conducen a la formación de estos compuestos han sido bien estudiadas en los ácidos grasos insaturados y exige la presencia de ácidos poliinsaturados así como su conjugación previa (21-26).

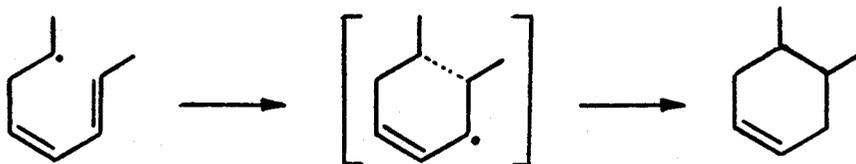
Una vez formado el dímero, la existencia de dobles enlaces disponibles en otros ácidos grasos de la molécula de triglicérido puede dar lugar a una posterior reacción produciendo trímeros que pueden, a su vez, continuar la polimerización.

Mediante estudios similares que envuelven el ácido oleico se ha demostrado que la adición Diels-Alder no es el único mecanismo posible en la polimerización térmica (27) (28). En efecto, la obtención de dímeros ha sido también explicada sobre la base de la formación y combinación de radicales alilo producidos por pérdida de un hidrógeno activo adyacente al doble enlace, como se muestra en la Figura 2.

La importancia relativa de ambas vías depende de la temperatura, de la concentración de ácidos grasos poliinsaturados y de la existencia de dobles enlaces conjugados.

b) Formación de monómeros cíclicos

El tratamiento térmico conduce también a la formación de monómeros cíclicos, como se demostró a partir del linoleato de metilo por Michael (29) y del aceite de soja parcialmente hidrogenado por Artman y Alexander (3). El mecanismo por el que estos compuestos se originan parece ser que envuelve la abstracción de un hidrógeno en posición alílica, seguido de adición intramolecular del radical libre al doble enlace:



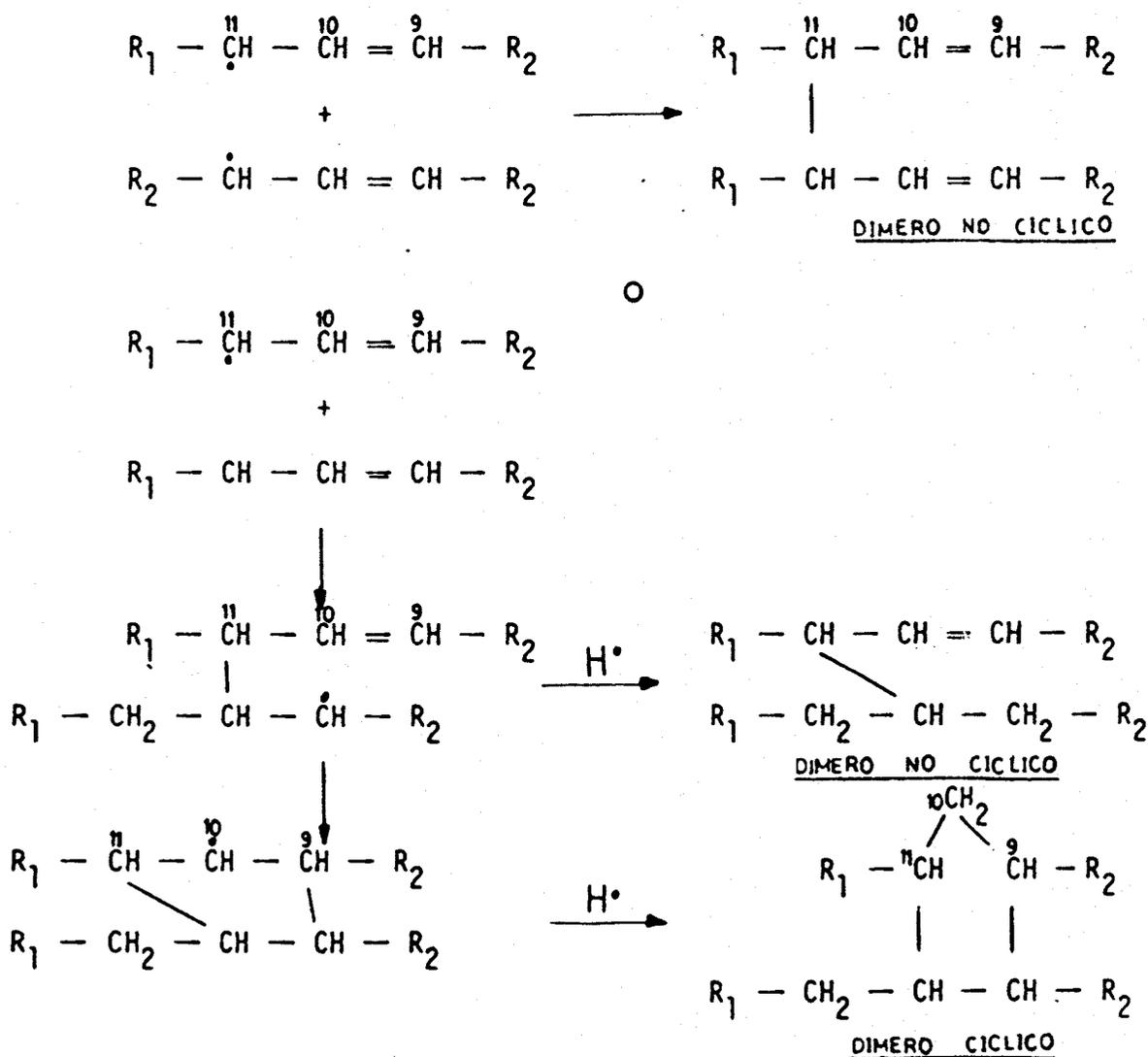


Figura 2.- Formación de dímeros térmicos a partir del ácido oleico

El interés por el estudio de estos compuestos se relaciona con su potencial toxicidad (30-32), pero su formación sólo es significativa en aceites con elevado contenido en ácido linolénico.

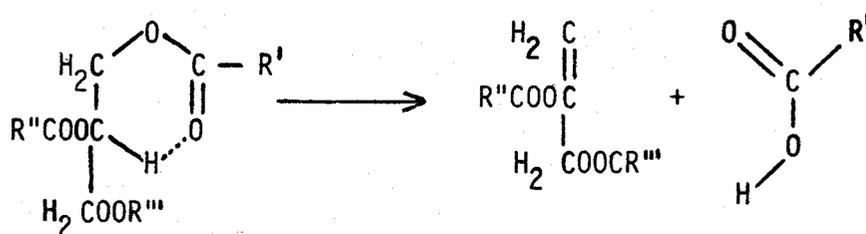
Aunque los compuestos mayoritarios de este grupo son derivados ortodisustituídos de anillos de 6 átomos de carbono, se han aislado también derivados ciclopenténicos y ciclopentadiénicos, identificados mediante resonancia magnética nuclear y determinados mediante espectrofotometría a 515 y 580 nm (33).

c) Reacciones termolíticas

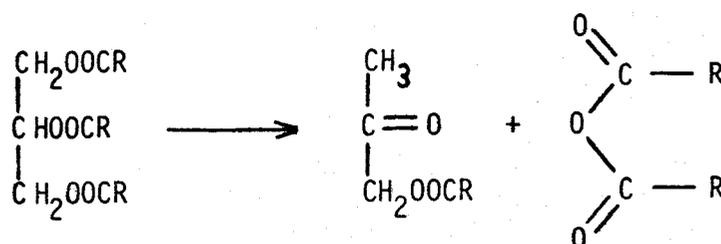
Dada la importancia mayoritaria de las reacciones que afectan a las cadenas insaturadas en el conjunto de los compuestos originados por vía exclusivamente térmica, la información sobre las reacciones termolíticas se han obtenido a partir de triglicéridos puros constituidos por ácidos grasos saturados.

Los productos característicos producidos en el calentamiento de estos triglicéridos son los siguientes: series de alcanos y 1-alquenos normales predominando el alcano C_{n-1} , ácido graso C_n , cetonas simétricas C_{2n-1} , oxopropilésteres C_n , propeno y propanodiolésteres, diglicéridos C_n , acroleína, CO y CO_2 ; siendo n el número de átomos de carbono del ácido graso saturado (34) (35).

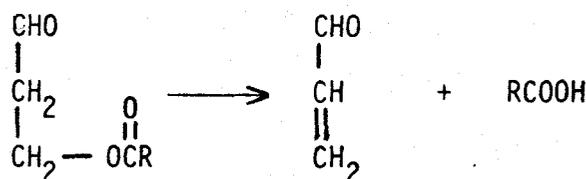
Cuantitativamente, los compuestos mayoritarios son los ácidos grasos libres producidos por descomposición termolítica del triglicérido (1). En un sistema exento de humedad, los ésteres que poseen un hidrógeno β en el componente alcohólico pueden formar un anillo de seis átomos de carbono, por medio de un puente de hidrógeno. El reajuste de electrones da lugar a un ácido y a una olefina:



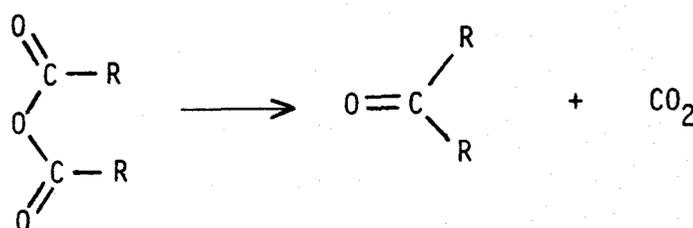
Por otra parte, la eliminación de un anhidrido ácido de la molécula de triglicérido produce 1 ó 2 oxopropilésteres y el anhidrido ácido según:



y la descomposición de 1-oxopropilésteres origina acroleína y ácidos grasos:



Finalmente, la descarboxilación del anhidrido ácido puede producir la cetona simétrica:



En lo que se refiere a los compuestos volátiles, los más característicos son las series de alcanos y alquenos originados por escisión homolítica C-C a lo largo de la cadena de ácido graso. Debido a su pequeña proporción en la mezcla total de compuestos de alteración, a la baja significación sensorial de los hidrocarburos y a su eliminación de la grasa por su elevada volatilidad, han sido objeto de menor consideración (1).

1.2.2.- Alteraciones oxidativas

Aunque existen diferencias sustanciales entre la alteración oxidativa a baja temperatura y a alta temperatura, los datos acumulados demuestran que en ambos casos la vía principal de obtención de compuestos de alteración incluye la formación de hidroperóxidos (36).

Es bien conocido hoy que la autoxidación tiene lugar a través de un proceso general que envuelve 4 fases que explican toda la gama de compuestos nuevos formados y que se resumen a continuación:

- 1.- Iniciación : Abstracción de un hidrógeno de un grupo metileno adyacente al doble enlace.
- 2.- Propagación : Reacción del radical formado con el oxígeno atmosférico con formación de peróxidos y posterior interacción de éstos con nuevas moléculas insaturadas para originar hidroperóxidos.
- 3.- Ramificación : Descomposición de hidroperóxidos incrementando la concentración de radicales libres.
- 4.- Terminación : Eliminación de radicales del sistema para formar compuestos estables.

La Figura 3 recoge sintéticamente algunas posibilidades de formación de radicales y compuestos entre los que destacan dos

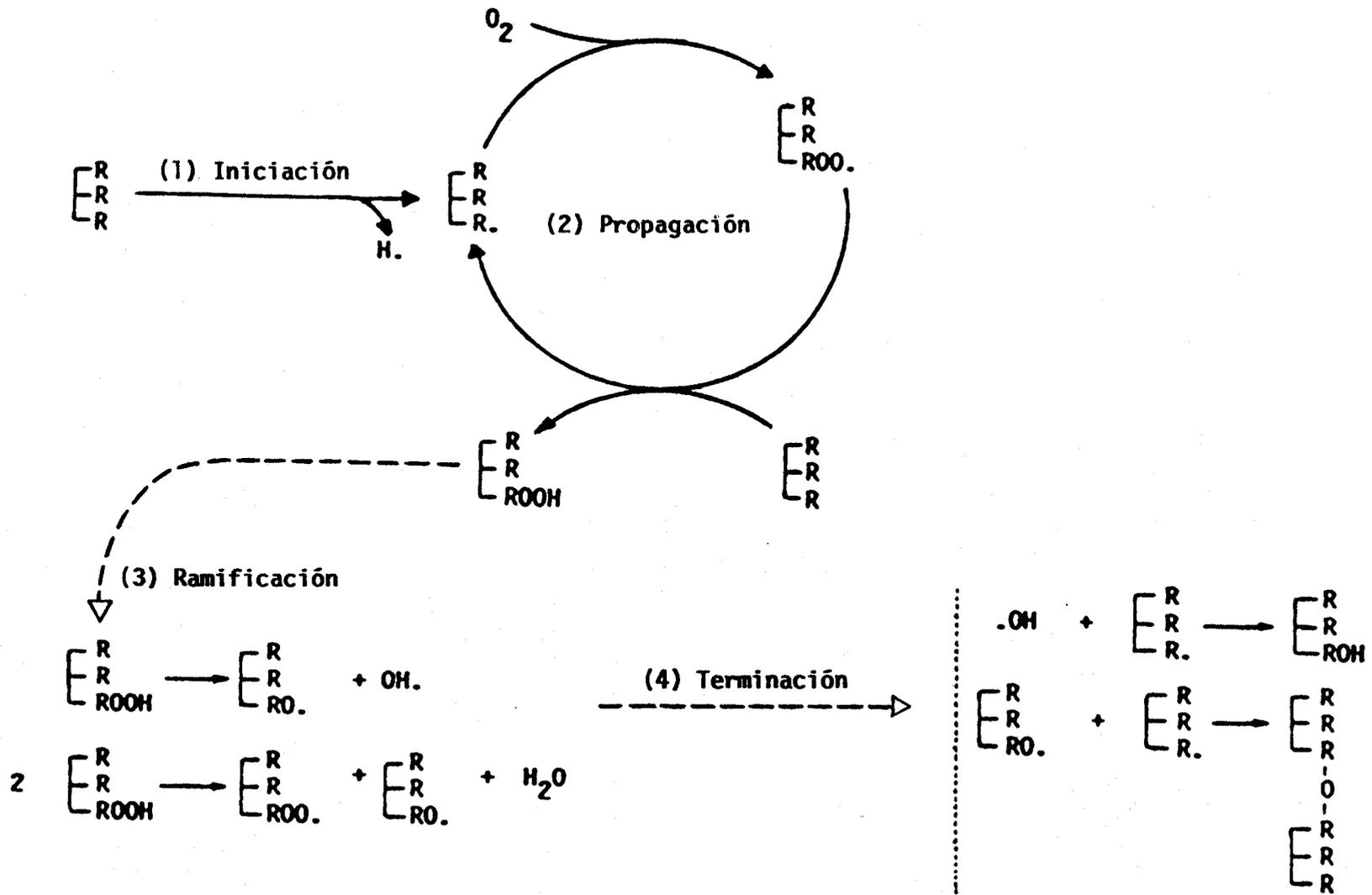


Figura 3.- Esquema general del proceso de autoxidación.

grupos: monómeros oxidados y compuestos de polimerización. Un tercer grupo de compuestos, que se analizan separadamente, incluye la escisión del resto acilo constituyente del triglicérido con formación de compuestos volátiles (37).

Es interesante destacar las principales diferencias que introduce la variable temperatura en tan complejo mecanismo, por su repercusión en los productos de degradación obtenidos:

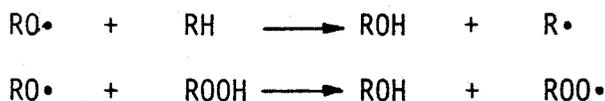
a) A baja temperatura, la velocidad de formación de los hidroperóxidos es mayor que su descomposición, que tiene lugar a través de la vía monomolecular y, por tanto, los compuestos son fundamentalmente triglicéridos oxidados monómeros.

b) A elevada temperatura, la velocidad de ramificación de los ROOH a través de la descomposición bimolecular es mayor que su formación. La concentración de los hidroperóxidos es prácticamente cero y los principales compuestos originados son dímeros y polímeros ya que los radicales con posibilidad de interaccionar son glicerídicos (38).

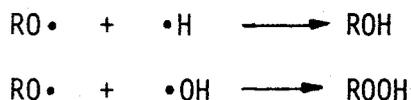
Por otra parte, al acelerar la temperatura todas las reacciones de la cadena autoxidativa, la cantidad de compuestos de alteración obtenidos a temperatura elevada es mucho mayor y su distribución depende del tiempo de calentamiento.

a) Monómeros oxidados

Estos compuestos, que se obtienen en mucha menor proporción a elevada temperatura, se originan tanto mediante reacciones de propagación:



como de terminación:



Al igual que en el caso de los dímeros y polímeros, la estructura de este grupo de compuestos es sumamente compleja, como puede observarse en la Figura 4, donde se recogen los compuestos identificados a partir de oleato y linoleato de metilo (37).

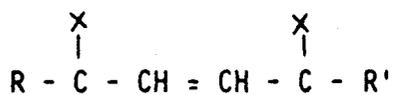
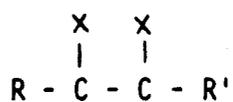
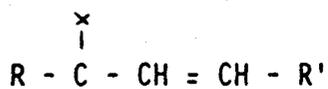
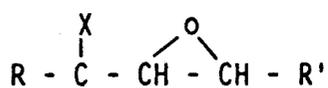
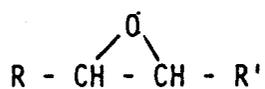
La importancia de los monómeros oxidados se debe a su rápida formación cuando el calentamiento es discontinuo ya que, durante el periodo de enfriamiento, la velocidad relativa de las fases de propa_gación e iniciación se invierte, predominando en la fase de ramificación la descomposición monomolecular de los hidroperóxidos.

b) Polimerización oxidativa

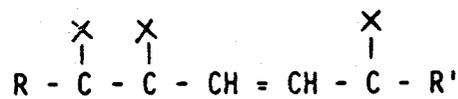
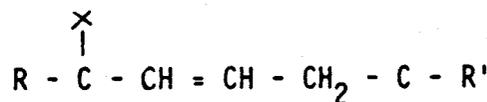
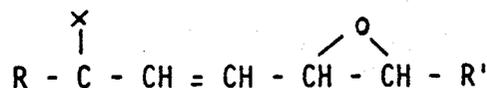
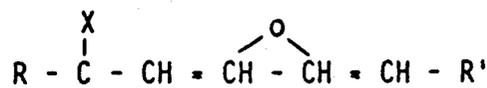
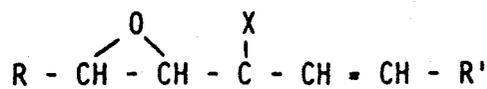
Muchos estudios han sido publicados sobre la naturaleza de los compuestos dímeros y de elevado peso molecular que son los productos mayoritarios de la oxidación a elevada temperatura (22) (39) (40).

La dimerización, que constituye el primer paso de la polimerización, transcurre a través de cuatro reacciones principales que dan lugar a dímeros no polares (C-C), puente éter (C-O-C), y puente peróxido (C-O-O-C), respectivamente, (23) (37).

Oleato

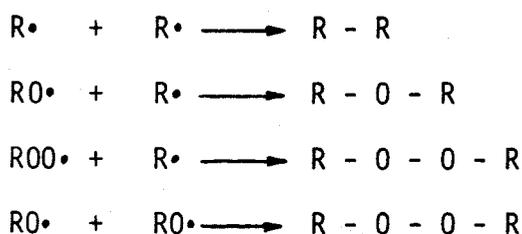


Linoleato



C - X = CO, CH - OH, CH - OOH

Figura 4.- Monómeros oxidados identificados a partir de oleato y linoleato de metilo.



La existencia de hidrógenos activos en otros puntos de la molécula pueden continuar la reacción de polimerización, produciéndose así una mezcla de compuestos de muy diferente polaridad si se tiene en cuenta, además, que las moléculas constituyentes pueden poseer grupos polares en otros puntos de la cadena. Debido a las dificultades analíticas envueltas en el estudio de mezclas complejas de este tipo, la estructura de muchos de los compuestos así como la influencia de las variables del proceso sobre las diferentes reacciones permanecen aún pendientes de resolver (41).

Es importante señalar que aunque los dímeros y polímeros no polares (enlace C-C) se han considerado compuestos característicos de la alteración térmica en condiciones no oxidativas, su formación es también posible a través de la vía oxidativa siendo una de las clásicas reacciones de eliminación de radicales libres. La importancia de estos compuestos en el conjunto puede ser considerable, sobre todo si existe limitación en la disponibilidad del oxígeno, como ocurre en la oxidación no forzada. En estas condiciones, la fase limitante es la propagación, mientras la reacción de iniciación que da lugar a los radicales $R\cdot$ se encuentra muy acelerada.

c) Componentes volátiles

Las reacciones ya citadas dan lugar a la formación de componentes de oxidación no volátiles que tienen, como mínimo, un peso molecular similar al de la molécula de que proceden. Un tercer grupo de compuestos originados en la alteración oxidativa se caracteriza, sin

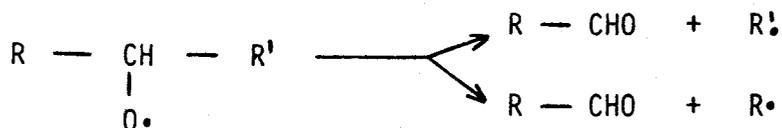
embargo, por su elevada volatilidad y bajo peso molecular.

Los componentes volátiles originados en la oxidación a elevada temperatura supone sólo una pequeña parte del total de los compuestos de alteración. No obstante, su extraordinaria importancia desde el punto de vista sensorial ha contribuido al desarrollo de estudios por parte de los más importantes grupos de trabajo en el campo de las grasas (35) (42-44).

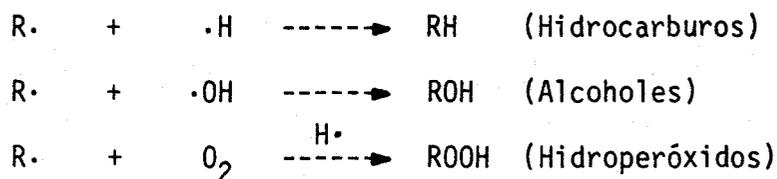
Aún cuando no existe acuerdo sobre el término componente volátil, dada la inexistencia de relación entre la volatilidad de los compuestos orgánicos y sus umbrales de detección olfativa, en este apartado consideramos los obtenidos por escisión del resto acilo, es decir, compuestos de menor peso molecular que el del resto acilo del que proceden.

Una excelente revisión realizada por Frankel (36) muestra que la composición cualitativa de los componentes volátiles originados depende fundamentalmente de las cadenas grasas insaturadas implicadas y que su esquema de formación se repite ya sea utilizando como base ácidos grasos, ésteres metílicos, hidroperóxidos o triglicéridos puros.

En síntesis, los componentes volátiles se originan a partir del radical alcoxilo, por escisión homolítica a ambos lados del citado radical que produce un aldehído estable:



El radical $R\cdot$ o R^1 a su vez, dada su labilidad, puede reaccionar con otros radicales en juego para dar lugar a compuestos estables:



Estas cadenas más cortas de hidroperóxidos pueden iniciar el proceso de formación de volátiles para originar aldehidos más cortos o, por el contrario, interaccionar con otros radicales originados en el proceso global, para incrementar su peso molecular.

Reacciones similares obtenidas a partir de R^1 , que porta el grupo carboxilo, darían lugar a ácidos, hidroxiaácidos o aldehidos ácidos de cadena corta como compuestos estables cuando se oxidan ácidos grasos, aunque en el caso concreto de los triglicéridos R^1 quedaría unido al glicerol formando parte de una molécula no volátil (45) (46).

La influencia de la temperatura en la cantidad de componentes volátiles originados es enorme, pero la mayor significación de estos compuestos está relacionada con el mecanismo de autooxidación a baja temperatura. En efecto, aunque a baja temperatura la cantidad de compuestos de oxidación total es muy pequeña, la formación de aldehidos y cetonas de umbrales de detección muy bajos, modifica sustancialmente las características organolépticas de la grasa, siendo su principal consecuencia la aparición de rancidez (43). A elevada temperatura, sin embargo, la mayor parte de estos compuestos se eliminan del sistema debido a su volatilidad, y el mayor interés recae en la elevada cantidad de componentes no volátiles originados cuyas propiedades nutricionales son desconocidas (47).

En resumen, en una grasa sometida a la acción de la temperatura y del oxígeno se originan una amplia serie de compuestos

nuevos, volátiles y no volátiles, cuya distribución es difícil predecir y depende fundamentalmente de la insaturación de la grasa, de la disponibilidad de oxígeno, de la temperatura, de la continuidad o discontinuidad en el calentamiento y del tiempo de tratamiento (5) (48-51).

**1.2.3.- Compuestos específicos originados en
grasas comestibles termoxidadas**

Puesto que las grasas son mezclas de triglicéridos constituidos por distintos ácidos grasos, el resultado de la alteración termoxidativa es una complejísima combinación de los productos de descomposición de los distintos ácidos grasos constituyentes.

Por otra parte, dado que la mayor parte de las grasas termoxidadas comestibles han estado destinadas a los procesos de preparación de los alimentos, hay que considerar también, aquellos compuestos producidos específicamente como consecuencia de la presencia del sustrato, cuya influencia en el conjunto es compleja de analizar, dada la amplia posibilidad de interacciones que pueden establecerse entre los productos de alteración de la grasa y otros componentes lipófilos y no lipófilos del alimento (52-54).

No obstante, desde el punto de vista cuantitativo, la principal modificación en la grasa es la introducida por la humedad del alimento cuya consecuencia es la hidrólisis de los triglicéridos.

Es importante comentar que, mientras la alteración oxidativa tiene lugar fundamentalmente en las cadenas grasas insaturadas constituyentes de los triglicéridos y, por tanto, los productos de alteración son triglicéridos con alguno de sus restos acilo alterados, la hidrólisis envuelve la rotura del enlace ester con la consiguiente formación de ácidos grasos libres, monoglicéridos, diglicéridos y glicerol.

En síntesis, en las grasas comestibles que han sido sometidas a calentamiento coexisten los productos de alteración térmica, oxidativa e hidrolítica y, en el caso específico de las grasas de fritura que son reutilizadas, pueden encontrarse los productos de oxidación producidos tanto a baja como a elevada temperatura. Es necesario tener en cuenta también que las alteraciones están interrelacionadas. Así, es conocido que los ácidos grasos originados en la hidrólisis, son más susceptibles de sufrir alteración térmica y oxidativa que cuando están esterificados (36) aunque, por otra parte, el agua disminuye la reactividad de los hidroperóxidos (55) (56) y establece una barrera a la solubilización del oxígeno atmosférico cuando la temperatura es superior a 100°C (57).

En conclusión, la superposición de las tres alteraciones más importantes que experimentan las grasas y la posibilidad de solubilización de componentes lipofílicos del alimento, dan lugar a una complejidad tal que es imposible predecir a priori la composición cuali o cuantitativa de la mezcla de productos resultantes de la fritura de un alimento. Es posible, sin embargo, aunque el proceso sea degradativo y sea inevitable la acción de las tres variables, seleccionar las mejores condiciones de las variables externas para disminuir la alteración total producida, entre las cuales destaca por su importancia el grado de insaturación de la grasa, que merece un comentario particular.

La influencia de la composición de la grasa está directamente relacionada con la distinta susceptibilidad a la oxidación de los ácidos grasos.

En efecto, se ha comprobado que la velocidad de autooxidación para los tres principales ácidos constituyentes de la grasa (oleico, linoleico y linolénico) es proporcional a 1 : 40-50 : 100 en lo que se refiere a la absorción de oxígeno y a 1 : 12 : 25 en cuanto a la formación de hidroperóxidos (37).

Los resultados indican que la oxidación se incrementa

enormemente cuando se pasa del ácido oleico al linoleico y la explicación es sencilla considerando la fase de iniciación de la cadena autoxidativa ya que, dada la posición de los dobles enlaces en el caso de los ácidos poliinsaturados, existe un sistema pentadiénico con un carbono en posición especialmente activada por la influencia simultánea de dos dobles enlaces. Esta situación, que no puede existir en el caso del ácido oleico, se encuentra duplicada en el ácido linolénico.

La alteración obtenida en grasas de fritura de diferente grado de insaturación no reproduce, sin embargo, las diferencias que serían de esperar a partir de los resultados anteriores, obtenidos con sistemas modelo de ácidos grasos o ésteres metílicos puros, debido, fundamentalmente, a la acción catalítica de los ácidos grasos poliinsaturados respecto a los de menor insaturación y a la importancia de la alteración hidrolítica que afecta al enlace éster y no depende de la insaturación de la grasa. No obstante, está suficientemente comprobado el papel prioritario de la oxidación en la formación de los compuestos de menor valor nutricional y la importancia de utilizar en la fritura grasas de insaturación media o baja, exentas de prooxidantes.

1.2.4.- Evaluación analítica de la alteración

El incremento en el consumo de grasas que han sido sometidas a elevadas temperaturas, ha tenido como consecuencia que distintos sectores, entre los que destacan las Administraciones Públicas y los Consumidores, estén interesados en conocer el alcance de la alteración producida en las grasas para establecer límites a su utilización. Por ello, uno de los objetivos fundamentales en el estudio de las grasas termoxidadas es encontrar métodos analíticos, exactos y reproducibles, que proporcionen una buena medida de la degradación producida en la termoxidación.

En pasadas décadas, debido a la complejidad de los compuestos originados, la evaluación estaba basada exclusivamente en índices analíticos de carácter general (viscosidad, índice de peróxidos, acidez... etc.) relacionados con grupos de compuestos originados en la termoxidación, pero sin posibilidad de establecer una relación entre la variación de estos índices y la alteración total.

El desarrollo de las técnicas cromatográficas de separación ha abierto en los últimos años perspectivas más favorables desde el punto de vista analítico y ha permitido iniciar la puesta a punto de métodos que evalúen la alteración de forma más directa, cuantificando los nuevos productos de alteración.

Este capítulo se ha dividido en tres apartados que responden a las tendencias más destacadas en el análisis de grasas termoxidadas:

- 1) Evaluación mediante índices de carácter general.
- 2) Cuantificación de productos mayoritarios de alteración.
- 3) Sistemáticas analíticas para la evaluación general de la alteración.

1.2.4.1.- INDICES ANALITICOS

El desarrollo de la alteración termoxidativa origina una serie de cambios físicos y químicos en la grasa, alguno de ellos fácilmente observables, entre los que destacan:

- 1.- Variación de los caracteres organolépticos, caracterizado por el desarrollo de olores y sabores típicos relacionados con los componentes volátiles.
- 2.- Incremento de la viscosidad y densidad como consecuencia de las reacciones de polimerización.
- 3.- Oscurecimiento atribuido a la presencia de compuestos carbonílicos insaturados o componentes polares del alimento solubilizados en la grasa.
- 4.- Tendencia a la formación de espuma relacionada también con los productos de polimerización y sustancias anfifílicas procedentes del alimento.
- 5.- Disminución del punto de humo debido a la eliminación de componentes volátiles.
- 6.- Incremento de la extinción específica a 232 y 270 nm como consecuencia de la formación de dobles enlaces conjugados y compuestos carbonílicos α , β - insaturados.
- 7.- Variación en la composición de ácidos grasos caracterizada por el incremento de los ácidos saturados en relación a los insaturados, más propensos a sufrir alteración.
- 8.- Aumento de la acidez libre fundamentalmente debido a reacciones de hidrólisis.
- 9.- Disminución del índice de Iodo que tiene lugar a medida que se eliminan dobles enlaces en las reacciones de polimerización, ciclación, etc.

Todos estos cambios generales han sido utilizados para la evaluación de las grasas termoxidadas o de fritura, y sus variaciones han servido para establecer diferencias en el comportamiento de distintos aceites y grasas (58-62), para analizar la influencia de distintas variables (63-67), o, incluso, partiendo de un aceite y condiciones determinadas, evaluar la correlación entre las medidas que dichos índices proporcionan (65) (68-70).

Entre sus características destacan su fácil y rápida realización, no requerir equipos costosos o de difícil manejo y proporcionar resultados exactos y reproducibles, todas ellas características positivas que los hacen muy apropiados como métodos de control en industrias relacionadas con la fritura de alimentos. No obstante, hay que tener presente una exigencia mínima que debe cumplir cualquiera de ellos y es, lógicamente, que su valor esté relacionado con la alteración producida y sólo con ella. Desde este punto de vista, los índices clásicos no están exentos de alguno de los siguientes inconvenientes:

- 1.- Necesidad de tomar como valor de referencia el de la grasa no calentada.
- 2.- Evaluación de un aspecto muy parcial de la alteración e incluso, en algún caso, no directamente relacionado con ella.
- 3.- Dependencia de otros factores ajenos a la alteración de la grasa y más influenciados por la solubilización de componentes del alimento.

No obstante, la enumeración de los inconvenientes de los índices sólo pretende avisar sobre la utilización indiscriminada de los mismos y no implica, de ningún modo, la duda sobre su eficacia y utilidad en situaciones donde se demuestre su validez (71) (72). Tal demostración hace referencia al conocimiento de la relación existente entre su variación y la alteración total producida, para lo que es fundamental disponer de métodos analíticos que evalúen directamente los compuestos de degradación (73).

1.2.4.2.- CUANTIFICACION DE LA ALTERACION TERMOXIDATIVA

La medida directa de la alteración tiene la enorme ventaja de eliminar los inconvenientes de los índices clásicos, ya que, junto a la posibilidad de evaluar compuestos específicamente relacionados con la degradación, existe un claro valor de referencia para la grasa inicial, donde la cantidad de los compuestos alterados debe ser prácticamente nula.

El desarrollo de estos métodos está directamente relacionado con la mejora de las técnicas cromatográficas, como puede verse en la Tabla II, donde se resumen las principales determinaciones, diferenciadas en dos grupos según se trate de obtener una medida global de la alteración producida o la cuantificación de grupos específicos de compuestos.

a) Determinación de la alteración global

El objetivo de estas determinaciones es la separación de la muestra en dos fracciones, conteniendo una de ellas la parte de la grasa que queda sin alterar, mientras en la segunda se concentran los productos de degradación. La diferencia de polaridad entre ambos grupos de compuestos constituye la base de esta separación que puede realizarse partiendo de la propia grasa, lo que sin duda simplifica la metódica analítica, o bien obteniendo previamente derivados más simples de triglicéridos, fundamentalmente ésteres metílicos, para disminuir la complejidad de la muestra.

La determinación de la alteración partiendo directamente de la grasa, ha sido puesta a punto utilizando la cromatografía líquida (75-78), y la cromatografía clásica en columna (79-82).

En el primer caso, el análisis se realiza en sólo 20 minutos con resultados muy reproducibles, pero exige un complicado sis-

Tabla II.- Métodos analíticos para la cuantificación de la alteración termoxidativa.

DETERMINACION ANALITICA	TECNICA UTILIZADA
1. <u>Determinación global</u>	
- Compuestos Polares (triglicéridos)	Cromatografía en columna de sílice Cromatografía líquida
- Material no eluido (ésteres metílicos)	Cromatografía gas-líquido
- Esteres metílicos no polares	Cromatografía en columna de sílice Cromatografía gas-líquido
2. <u>Determinaciones específicas</u>	
- Monómeros cíclicos (ésteres metílicos)	Cromatografía gas-líquido
- Dímeros (ésteres metílicos)	Cromatografía gas-líquido
- Dímeros no polares (triglicéridos o ésteres metílicos)	Cromatografía líquida

tema de acondicionamiento de la columna así como disponer de un instrumental sofisticado. Por otra parte, la obtención de resultados fiables está condicionada a un tratamiento complicado del eluyente de la columna consistente en la eliminación del disolvente, combustión y reducción de los productos de pirólisis a metano que pasa finalmente a un detector de ionización de llama. Por el contrario, el método que utiliza la cromatografía en columna, también de elevada reproducibilidad, se caracteriza por la simplicidad de los medios requeridos para su puesta a punto y ha sido recomendado por la I.U.P.A.C. para la evaluación de grasas de fritura.

El método consiste en la separación en columna de sílice de 1 gramo de grasa en condiciones muy bien normalizadas. Mediante elución con hexano:éter 87:13, se obtienen los triglicéridos no alterados y en una posterior elución con éter etílico se recogen los compuestos más polares, determinándose ambas fracciones gravimétricamente.

En cuanto a los métodos de evaluación total de la alteración partiendo de los ésteres metílicos, cabe destacar el semimicrométodo desarrollado por Guillaumin para la determinación de especies químicas nuevas mediante cromatografía en columna de alúmina, obteniendo distintas fracciones eluidas con disolventes de polaridad creciente (83), y la determinación de compuestos no eluidos en cromatografía gas-líquido (84). No obstante, la reproducibilidad de estos métodos que parten de una pequeña cantidad de muestra, es muy inferior a la de los procedimientos descritos anteriormente.

Por ello, es interesante la modificación realizada para aplicar a los ésteres metílicos la metodología recomendada por la IUPAC anteriormente citada (85). Después de la transesterificación de la grasa y la elección del disolvente apropiado para compensar la diferencia de polaridad entre los triglicéridos y los ésteres metílicos, es posible obtener una medida cuantitativa de los ácidos grasos que han sufrido alteración, con los mismos valores de reproducibilidad que la determinación en la que está inspirada.

La principal diferencia entre ambos métodos es que cuando se utiliza la grasa se obtiene una medida de la alteración total originada, mientras que partiendo de los ésteres metílicos se evalúan sólo los ácidos grasos producidos por alteración oxidativa y térmica. Dada la necesidad de relacionar los compuestos de alteración originados con sus propiedades fisiológicas, esta última medida tiene mayor significación puesto que excluye la cuantificación de los productos de hidrólisis cuya participación en la modificación de las propiedades de la grasa es nula por ser los originados por acción enzimática previa a la absorción.

b) Determinación de compuestos específicos de la alteración

Uno de los objetivos más perseguidos en el análisis de grasas termoxidadas es el de encontrar compuestos específicos de la alteración que puedan ser cuantificados con exactitud. Entre los más representativos figuran los monómeros cíclicos y compuestos poliméricos en cuyas determinaciones se ha avanzado sensiblemente en la última década, aunque pueden ser todavía mejorados.

Monómeros cíclicos

La importancia de estos compuestos, que se originan por ciclación intramolecular de ácidos grasos poliinsaturados, es debida tanto a su toxicidad potencial como a su especificidad respecto de la alteración térmica.

Su determinación se realiza a partir de los ésteres metílicos, mediante cromatografía gas-líquido previa hidrogenación de la muestra (86), incluyendo la mayoría de los métodos un paso intermedio de aducción con urea (87) (88), o cristalización a baja temperatura (89), para eliminar la mayor parte de los ésteres metílicos no alterados y conseguir una concentración de los compuestos de interés. No obstante, debido a la naturaleza química aún desconocida de algunos de los

monómeros cíclicos originados, a su baja concentración en la muestra total, y a la complejidad de la metódica utilizada, la exactitud y reproducibilidad del método son discutidas (90-92).

Su formación prioritaria a partir de ácidos grasos con 3 o más dobles enlaces, sólo confiere a esta determinación una importancia específica en la evaluación de aceites que contengan cantidades significativas de ácido linolénico que, precisamente por ello, son poco utilizados a elevada temperatura.

Compuestos poliméricos

La mayoría de los métodos analíticos puestos a punto para la evaluación de los compuestos de polimerización utilizan la cromatografía de permeación sobre gel, ya sea partiendo directamente de la muestra de grasa (77) (93-97) o de los ésteres metílicos (94) (98).

Aun cuando es una determinación de gran interés dada su relación con los cambios físicos más visibles producidos en la grasa, es difícil conseguir una buena separación de estos compuestos por constituir un grupo poco homogéneo tanto en peso molecular como en polaridad (22).

Especial atención merecen los dímeros formados en el primer paso de la reacción de polimerización y cuya valoración a partir de los ésteres metílicos resulta, en la actualidad, menos problemática. Su determinación se ha realizado mediante cromatografía gas-líquido utilizando fases no polares (100).

Dentro de este grupo de determinaciones destaca el método desarrollado para determinar en un mismo análisis los ésteres metílicos que no han experimentado degradación y los dímeros de baja polaridad producidos por alteración térmica (101). Para ello, se utiliza una fracción separada previamente mediante cromatografía en columna de sílice que contiene exclusivamente ambos grupos de compuestos, estable-

ciéndose las condiciones cromatográficas para garantizar su separación posterior en un periodo corto de tiempo. Se pueden obtener así dos valores representativos de la alteración termoxidativa y térmica en un mismo análisis.

1.2.4.3.- SISTEMATICAS ANALITICAS PARA LA EVALUACION DE LOS COMPUESTOS ORIGINADOS EN LA TERMOXIDACION DE GRASAS

Un tercer nivel de evaluación de las grasas termoxidadas está relacionado con los procedimientos complejos, que incluyen el fraccionamiento y el análisis estructural de los productos de alteración, cuyo objetivo es obtener una información completa y detallada de la distribución de los compuestos degradados. Esta información es esencial para la definición de los efectos fisiológicos de los diferentes grupos de compuestos y para el desarrollo de métodos analíticos más simples que puedan servir de control de la alteración. Los sistemas más clásicos están basados en diferencias de solubilidad (102) (103), de volatilidad (104-106) o en la distinta capacidad de los compuestos para formar aductos con la urea (107-109). No obstante, la imposibilidad de obtener separaciones bien definidas utilizando las diferencias de solubilidades, la posibilidad de formación de artefactos durante la destilación, y la dificultad de los ácidos grasos más insaturados para formar aductos, han ido relegando la utilización de estas técnicas de separación que han sido sustituidas por las cromatográficas.

El primer esquema basado exclusivamente en separaciones cromatográficas (41) es una excelente muestra de las posibilidades de combinación de estas técnicas aplicadas a los ésteres metílicos para obtener 5 grupos de compuestos de características bien definidas. Las dos fracciones básicas conseguidas por cromatografía de partición en fase inversa, son posteriormente recromatografiadas en base a diferencias de polaridad y de peso molecular respectivamente. Este estudio, que ha significado una importante contribución al conocimiento de los productos de alteración, no ofrece resultados desde el punto de

vista cuantitativo.

Merece igualmente ser destacada la compleja evaluación de grasas alteradas puesta a punto por Gere (49), que parte directamente de los triglicéridos y se desarrolla en dos secuencias independientes. En la primera se realiza una separación por pesos moleculares seguida de un fraccionamiento por polaridades, mientras en la segunda se realiza un fraccionamiento inverso: primero sobre columna de sílice por polaridad y a continuación por pesos moleculares utilizando la cromatografía de permeación sobre gel.

Finalmente, merece un comentario aparte la única sistemática analítica existente que, con fines exclusivamente cuantitativos, combina las técnicas de cromatografía en columna y gas-líquido, y el tratamiento de la muestra de grasa como tal con el análisis de los ésteres metílicos (110), utilizando como base los métodos analíticos más reproducibles. El procedimiento permite en una primera separación evaluar sobre la grasa la alteración cuantitativa total. A partir de los ésteres metílicos de los triglicéridos alterados, en una posterior separación se determina la cantidad de ácidos grasos no alterados, dímeros no polares y compuestos de oxidación y poliméricos.

En resumen, un análisis objetivo de las posibilidades analíticas actuales permite deducir que ha existido un significativo avance en la última década en el desarrollo de métodos directos de evaluación, aunque se sigue considerando que es necesario hacer un esfuerzo en la investigación de nuevas posibilidades analíticas o en la mejora de las determinaciones existentes.

**1.3.- CONSECUENCIAS DE LA INGESTION DE GRASAS
TERMOXIDADAS**

Los conocimientos actuales sobre los efectos fisiológicos de las grasas sometidas a condiciones de termoxidación han sido adquiridos en los últimos 30 años a través de un elevado número de estudios. Existen, por ello, varias revisiones bibliográficas sobre aspectos parciales o generales del tema, entre las que destacan las realizadas por Artman (2), Potteau y Causeret (111), Perkins (112), Grandgirard (113), Causeret (114) y Ruiz (115).

El examen de estas publicaciones muestra una gran divergencia en los resultados obtenidos. Mientras para ciertos autores el consumo de grasas termoxidadas tiene consecuencias negativas que incluyen, en ciertas experiencias, la muerte de los animales experimentales, para otros la diferencia con la grasa no calentada reside en leves consecuencias fisiológicas, sin que deba hablarse de toxicidad en sentido estricto. Finalmente, existen muchos estudios en los cuales no se encuentran diferencias entre grasas calentadas y frescas.

En el presente apartado se resumen las características generales de los estudios realizados, que justifican las discrepancias existentes, y se analizan los resultados de los trabajos más representativos, particularmente los relacionados con la cuantificación de compuestos absorbidos y no absorbidos. Finalmente se deducen las conclusiones obtenidas de esta revisión bibliográfica que pueden ser de interés general para la continuación de los estudios en este área.

1.3.1.- Características generales de los estudios

Es difícil sistematizar los resultados obtenidos sobre las consecuencias de la ingestión de grasas termoxidadas y, sobre todo, deducir de ellas conclusiones de validez general que puedan ser traducidas en recomendaciones útiles en relación con el consumo de grasas en la dieta.

A los problemas más clásicos de los estudios toxicológicos sobre cualquier sustancia - dificultades de extrapolar los resultados obtenidos en distintos animales experimentales, dosis suministradas, tiempo y tipo de tratamiento aplicado a los animales, etc. - que ocasionan múltiples discrepancias en el estudio de la acción sobre el organismo de compuestos puros, se unen los problemas derivados de la complejidad de las grasas que se pretenden evaluar.

En efecto, se ha expuesto en capítulos precedentes la amplia serie de modificaciones que experimenta la grasa durante el tratamiento termoxidativo y la dificultad que existe para caracterizar, tanto cualitativa como cuantitativamente, los compuestos originados. Por ello, la opinión de los investigadores se ha orientado fundamentalmente en dos direcciones, sin dejar de reconocer cada grupo que existen también razones importantes para sustentar la contraria. Las dos orientaciones en los estudios se resumen en las siguientes ideas:

- 1.- El interés de los estudios toxicológicos y nutricionales sobre las grasas termoxidadas sería muy limitado si éstas no fuesen ingeridas

en la dieta. Por ello, no tiene mucha utilidad establecer condiciones abusivas muy alejadas de la situación de consumo real.

- 2.- Los efectos nutricionales y toxicológicos de las grasas termoxidadas deben depender de la acción de compuestos específicos cuyos niveles de ingestión se desconocen. Por tanto, es necesario obtener una información detallada sobre la acción de los citados compuestos en dosis muy superiores a las ingeridas para asegurar la salubridad de las grasas consumidas.

Esta falta de acuerdo en los objetivos queda reflejada en la Tabla III, donde se muestran las distintas muestras de grasa que han sido utilizadas en los estudios así como los valores más representativos de las principales variables implicadas. A partir de ella, se comprende fácilmente que, en cualquier caso, el efecto obtenido puede deberse a varios grupos de compuestos y, por ello, no es extraño que las conclusiones de los trabajos realizados sean controvertidas. Como puede observarse, los estudios incluyen distintos tipos de grasa y distintos tipos de calentamiento en lo que se refiere a temperatura, tiempo de aplicación y condiciones de tratamiento, que dan lugar a compuestos de alteración muy diferentes.

La consecuencia de esta situación es que, desgraciadamente, a pesar de la cantidad de estudios existentes, la posibilidad de establecer criterios generales aplicables se vislumbra aún muy lejana.

Tabla III.- Características generales de las grasas utilizadas en estudios nutricionales.

MUESTRAS	TRATAMIENTO	RANGO DE TEMPERATURAS	COMPUESTOS MAYORITARIOS
1.- Grasas de fritura	Exposición al aire sin borboteo	160 - 220°C	- Compuestos característicos de las alteraciones térmica, oxidativa e hidrolítica
2.- Grasas termoxidadas	Exposición al aire sin borboteo	180 - 220°C	- Compuestos característicos de las alteraciones térmica y oxidativa
3.- Grasas termoxidadas sometidas a oxidación forzada	Borboteo de aire	150 - 300°C	- Compuestos de oxidación de alto peso molecular
4.- Grasas sometidas a alteración térmica	Ausencia de aire	250 - 350°C	- Monómeros cíclicos - Dímeros y polímeros térmicos
5.- Grasas oxidadas a temperatura baja o media	Con o sin borboteo de aire	50 - 150°C	- Peróxidos - Monómeros oxidados - Dímeros oxidados
6.- Fracciones concentradas en compuestos de alteración	Con o sin borboteo de aire	20 - 350°C	- Acidos originados por alteración oxidativa y térmica

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO
INSTITUTO QUÍMICO DE MÉXICO

1.3.2.- Toxicidad potencial de las grasas termoxidadas

En este epígrafe se resumen los principales resultados obtenidos en los estudios toxicológicos de grasas termoxidadas en muy diferentes condiciones de tratamiento. Dado que el presente trabajo no está más que indirectamente relacionado con este aspecto, se pretende resumir la información más relevante que justifica en el momento actual la necesidad de disponer de mejores técnicas analíticas de evaluación cuantitativa para profundizar en la significación de los resultados obtenidos. Existen, por otra parte, excelentes revisiones (2)(14) donde puede encontrarse una información más detallada sobre el tema.

En general, puede decirse que los efectos observados por la ingestión de grasas termoxidadas son muy variados y que dosis elevadas de determinados compuestos son capaces de producir alteraciones en el organismo vivo. Los efectos más negativos se relacionan con los compuestos monómeros de oxidación producidos a temperaturas relativamente bajas y los compuestos monómeros de origen térmico, originados a elevada temperatura en ausencia de oxígeno. Ambos grupos de compuestos son, sin embargo, poco representativos de las condiciones de oxidación no forzada a elevada temperatura, máxime cuando se encuentra presente el alimento.

Dadas las diferentes condiciones de tratamiento utilizadas en las experiencias con animales experimentales, se han diferenciado los grupos de trabajo que podrían representar condiciones diferentes en cuanto a los productos de alteración obtenidos.

1.3.2.1.- GRASAS OXIDADAS A TEMPERATURAS POCO ELEVADAS

Los principales compuestos originados por este tipo de tratamiento son los compuestos de oxidación monoméricos. El incremento en la temperatura y en el grado de insaturación de la grasa favorecen de forma acelerada la formación de compuestos de polimerización.

Los estudios más interesantes y significativos han sido realizados por Kaunitz y col., y son clásicos para comprobar la influencia que tienen las condiciones de tratamiento en los resultados obtenidos.

Sus primeros estudios (116-119) muestran que la introducción en la dieta de un 20% de aceite de algodón calentado de 8 a 12 días a 95°C produce en las ratas una disminución clara del peso corporal y la muerte en algunas semanas. Se constata, al mismo tiempo, que la adición de aceite fresco a la dieta sin disminuir la cantidad del oxidado, atenúa marcadamente los efectos citados. Por otra parte, la fracción más polimérica aislada del aceite de algodón, introducida al 20% en la dieta, ocasiona la muerte de las ratas en una semana mientras que cuando disminuye el porcentaje, el crecimiento se interrumpe y sólo la mitad de los animales mueren.

Lo más curioso es que los propios autores concluyen que no puede decirse que cualquier oxidación a temperatura poco elevada origine una disminución en las propiedades nutricionales de la grasa, ya que posteriores estudios del mismo grupo (120) (121) prueban que la administración prolongada de distintas grasas comestibles oxidadas a 60°C, durante 40 horas, no produce retardo en el crecimiento e, incluso, la longevidad es algo superior a la de los animales testigos alimentados con la grasa no tratada.

La polémica relacionada con la acción de los compuestos de oxidación está originada, por tanto, desde el comienzo de los

estudios debido a los resultados obtenidos por un mismo grupo de trabajo y en condiciones de tratamiento similares.

1.3.2.2.- GRASAS SOMETIDAS A OXIDACION FORZADA A ELEVADA TEMPERATURA

En estas condiciones, los principales compuestos originados son dímeros y polímeros con múltiples funciones oxigenadas incluidas en la molécula (122).

Los resultados más significativos han sido obtenidos por el equipo de Kummerow-Perkins. La introducción de la grasa calentada a 180-200°C durante 24-48 horas, con borboteo de aire, produce una clara disminución del crecimiento, tanto mayor cuanto más rica es la grasa en ácidos poliinsaturados (123), aunque no se detecta ninguna diferencia en la tasa de mortalidad en relación con la ingestión de grasa fresca. El efecto negativo es atenuado si se incrementa el aporte vitamínico en la dieta (124).

Los autores han demostrado que los compuestos responsables se encuentran en la fracción constituida por los ácidos grasos no destilables y que no forman complejos con la urea (125), a pesar de que son menos sensibles a la acción de los enzimas hidrolíticos que intervienen en el paso previo a la absorción de la grasa (123). La muerte de una parte de los animales experimentales ha sido sólo constatada por otro grupo de trabajo utilizando aceites de pescado muy insaturados (126) (127).

1.3.2.3.- GRASAS ALTERADAS TERMICAMENTE EN AUSENCIA DE OXIGENO

Mientras la oxidación de la grasa en los estudios anteriormente descritos lleva implícita la acción de la temperatura en mayor o menor grado, la ausencia de la acción del oxígeno mediante la

protección de la muestra con un gas inerte, garantiza que los compuestos de alteración se deben a la acción de una sola de las variables de mayor interés. Por ello, los compuestos obtenidos, aunque poco representativos de las cantidades originadas en la termoxidación, son más específicos y han podido ser bien separados en dos importantes grupos:

- Ácidos monómeros cíclicos con núcleos ciclohexénicos, ciclohexadiénicos e incluso aromáticos.
- Dímeros y polímeros cíclicos y no cíclicos.

El principal procedimiento de separación utilizado combina la aducción con la urea, para separar por precipitación los ácidos grasos no alterados, y la posterior destilación de la fracción no aductable, para obtener en el destilado los compuestos monómeros y en el residuo la fracción polimérica.

Las conclusiones más interesantes se obtuvieron por los equipos de Crampton en Canadá en los años 50, trabajando con aceite de linaza que contiene un porcentaje muy elevado de ácido linolénico (128-130), y han sido posteriormente confirmados en todos los estudios que parten de aceites poliinsaturados (131-133). Los resultados indicaban que con sólo 12 horas de calentamiento a 275°C, se causaba la mortalidad de las ratas cuando el aceite se incluía en la dieta al 20%. El posterior fraccionamiento del aceite demostraba que la mayor toxicidad residía en la fracción destilable no aductable, es decir, en los ácidos monómeros cíclicos. La fracción polimérica, por su parte, originaba una disminución del crecimiento pero no parecía ser estrictamente tóxica. Además, se daba por hecho que los compuestos obtenidos, aún perteneciendo al mismo grupo, tenían distinta estructura, puesto que eran mucho menos activos si provenían de aceites de girasol o soja.

El interés de los resultados ha conducido al desarrollo de muchos estudios posteriores más profundos para conocer la forma de asimilación de estos compuestos. Así, Iwaoka y Perkins (134) observaron que la mayor parte de la radiactividad administrada bajo la

forma de ácidos monómeros cíclicos marcados con ^{14}C se encontraba en la orina y, más directamente, Grandgirard et al. (135) comprobaron que existe una cantidad elevada en la orina de ácido glucurónico conjugado, una de las vías principales de detoxificación, paralela a la presencia de monómeros cíclicos en la dieta.

No debe olvidarse, finalmente, que tales resultados no se obtienen más que cuando se utilizan aceites muy insaturados y que las condiciones se han elegido para favorecer la formación de compuestos no oxigenados, que se encuentran en cantidades inapreciables en las grasas consumidas.

1.3.2.4.- GRASAS TERMOXIDADAS EN AUSENCIA DE ALIMENTO

En este grupo están incluidos la mayor parte de los estudios realizados y en ellos se han obtenido los resultados más dispares y menos explicados. Mientras en otras situaciones la diferencia de comportamientos en distintas experiencias puede, en cierta parte, justificarse por el grado de insaturación de las grasas utilizadas o por los diferentes tipos de tratamiento, en este caso se obtienen en ocasiones resultados dispares utilizando la misma grasa y valores de la variables temperatura y oxígeno disponible muy similares (2) (3).

La principal razón de elegir este tipo de tratamiento, que consiste en calentar la grasa a elevada temperatura sin evitar la acción del oxígeno atmosférico, se debe a que los compuestos originados son representativos de los que se producen en las grasas comestibles y pueden obtenerse en condiciones de mayor control. En efecto, siempre que la temperatura se mantenga alrededor de 200°C , el tiempo de tratamiento no sea excesivo y se establezcan periodos de discontinuidad en el calentamiento, la mezcla de productos de alteración obtenidos que derivan de la existencia de ácidos grasos insaturados, debe incluir los compuestos presentes en grasas comestibles calentadas. Las principa-

les diferencias residen en la ausencia de los compuestos originados debido a la humedad del alimento y en la mayor concentración de los originados vía térmica u oxidativa.

Entre los trabajos realizados, la mayor parte de ellos indican la inexistencia de toxicidad crónica o aguda cuando las grasas son tratadas a temperaturas cercanas a los 200°C, durante tiempos que oscilan desde horas hasta 8 días y porcentajes en la dieta hasta del 20%, acusándose como máximo una ralentización del crecimiento y aumento del tamaño del hígado de los animales (136-140). Una excepción sorprendente la constituye el estudio de Binet y Wellers (141) que han observado una fuerte mortalidad en ratas sometidas a regímenes conteniendo el 16% de mantequilla, aceite de cacahuete o margarina calentado a 180°C durante 20 minutos.

Los estudios realizados con fracciones concentradas en productos de alteración muestran, sin embargo, una mayor variabilidad en los resultados (142-145) y permiten atribuir los efectos más nocivos a los compuestos monómeros cíclicos y oxidados así como a los dímeros polares. Por el contrario, los dímeros apolares y los polímeros no parecen tener un efecto significativo. Un resultado digno de atención, por su repercusión, es el obtenido por el grupo de trabajo de la Food and Drug Administration que constatan una fuerte mortalidad en animales muy jóvenes cuando se les suministra por intubación gástrica 1 ml/100 g de peso de la fracción no aductable con urea (146). Ellos mismos indican, no obstante, que la acción está muy influenciada por el contexto nutricional y que la mortalidad disminuye drásticamente si al mismo tiempo se les proporciona una alimentación equilibrada. Este último hecho ha conducido a estudios para conocer si la incorporación de grasa alterada a la dieta puede originar una rápida destrucción de nutrientes de la dieta o la perturbación de las rutas metabólicas que afectan a las vitaminas (147-149).

De la discusión anterior debe quedar de manifiesto que no existe un conocimiento detallado de las consecuencias de la ingestión

de grasas termoxidadas, para lo cual sería necesario trabajar con muestras mucho mejor definidas (2). No obstante, el principal valor de estos estudios ha sido estimular el desarrollo de trabajos en condiciones cada vez más parecidas a las que se dan en la práctica culinaria y dirigir las investigaciones hacia los efectos más relacionados con los compuestos presentes en las grasas que han sido usadas en la preparación de alimentos (150).

1.3.2.5.- GRASAS DE FRITURA

Hay un gran contraste entre el elevado número de estudios realizados con grasas calentadas a elevada temperatura en ausencia de alimento y el relativamente escaso de los que describen los efectos de grasas que han sido previamente utilizadas en fritura.

La causa principal es la reticencia de los investigadores a utilizar muestras cuyas variables de tratamiento son indefinidas, ya que frente a la indudable ventaja de los estudios relacionados con grasas de fritura, que reside en ser representativos de las ingeridas, su inconveniente más importante es la imposibilidad de extraer conclusiones de carácter general, por desconocimiento del tratamiento previo.

Sin embargo, la diversidad de resultados obtenidos en los estudios realizados con un mayor control y la indudable mejora introducida por las técnicas instrumentales de separación y cuantificación, particularmente la determinación de componentes polares glicéricos (79), han conducido al desarrollo en los últimos años de trabajos realizados en condiciones cada vez más reales (150).

En general, se observa que los estudios realizados con grasas de fritura indican la ausencia de toxicidad en sentido estricto (124) (150-153) y sólo la utilización de dietas conteniendo la fracción no aductable con urea resultó ser tóxica cuando se administraba a dosis muy elevadas (4) (154). En este caso, a partir de los resultados de estudios a largo plazo, los autores extraían la conclusión más aceptada

en la actualidad, que resumían en la siguiente idea: " Las grasas usadas en fritura contienen muy pequeñas cantidades de sustancias que son tóxicas para las ratas, cuando se administran en dosis muy elevadas, aunque la utilización total de la grasa de que provienen no produce efectos apreciables en los animales que las consumen".

Finalmente, un estudio que merece ser comentado aparte por su diferencia con todos los anteriores, ha sido realizado por el grupo de Billek en Alemania (155-157). Este grupo ha desarrollado el primer método analítico de utilización general para la cuantificación global de todos los compuestos de degradación en las grasas de fritura que, como ya hemos comentado, utiliza la cromatografía en columna directamente sobre la grasa. Tal separación se ha aplicado en escala industrial a los aceites de girasol desechados de una industria dedicada a la preparación de productos prefritos y las fracciones obtenidas, así como el aceite original no calentado y el aceite de fritura, se han utilizado para alimentar 4 grupos de ratas a largo plazo. El interés del estudio consiste en que, por primera vez, se suministra a animales experimentales una fracción concentrada en compuestos de degradación con la misma estructura en que se encuentran en la grasa, y los resultados obtenidos indican que sólo la dieta que contiene la fracción alterada al 20% provoca una pequeña pero significativa reducción en el crecimiento y un incremento del peso de hígado y riñones. Teniendo en cuenta que los animales se recuperan fácilmente cuando vuelven a una dieta normal y que la cantidad de productos de alteración incluida en la dieta es excesiva, puesto que significaría un consumo diario superior a 1 Kg de compuestos de alteración en una persona de 70 Kg de peso, los autores concluyen que el consumo de grasas de fritura no supone ningún riesgo para la salud.

La conclusión más relevante del conjunto de estudios dirigidos a conocer la acción en el organismo de los compuestos originados durante la termoxidación de las grasas, es la necesidad de sustituir la evaluación de las muestras basada en las condiciones de tratamiento por el conocimiento de los niveles en que se encuentran los grupos de compuestos más representativos que pueden influir en las propiedades fisiológicas de las grasas. Sólo de esta forma será posible, en una primera etapa, establecer una comparación de resultados entre distintos estudios basada en la alteración real producida.

**1.3.3.- Absorción y digestibilidad de
grasas termoxidadas**

Se entiende por absorción el proceso por el cual los componentes de la dieta atraviesan la pared intestinal antes de ser conducidos a los órganos de utilización o de reserva. En el caso específico de las grasas, los compuestos que sufren el proceso son los ácidos grasos y monoglicéridos, originados por acción de la lipasa pancreática, los cuales después de ciertas transformaciones en el seno de las células intestinales, pasan al sistema linfático primero y posteriormente a la sangre, antes de alcanzar los órganos de destino. Un comportamiento similar de los compuestos originados en la termoxidación implicaría su paso por la linfa antes de invadir el organismo donde podrían provocar problemas si son tóxicos. Por el contrario, si los compuestos de alteración no son absorbidos a nivel de la mucosa intestinal serán eliminados directamente en las heces.

Uno de los problemas suscitados en los estudios que tratan de establecer las propiedades fisiológicas de las grasas termoxidadas, es el definir las dosis a partir de las cuales se manifiesta una determinada acción. La atribución de efectos negativos a los monómeros cíclicos y oxidados, ambos de elevada tasa de absorción y peso molecular similar a los ácidos grasos libres, plantea la cuestión de la relación entre toxicidad potencial y absorción. En otras palabras, dada la dificultad para establecer los efectos de tan complejo grupo de compuestos sería necesario establecer las posibilidades de absorción de los grupos más representativos antes de analizar su eventual toxicidad, ya que moléculas sin posibilidad de ser absorbidas, incluso si presentan

una apreciable toxicidad cuando se hacen llegar directamente a la corriente sanguínea, no tendrían efectos apreciables caso de ser ingeridas.

El estudio de la absorción intestinal y la determinación de la digestibilidad de las grasas termoxidadas responden a este planteamiento, siendo ambos aspectos complementarios de la evaluación del proceso de absorción. Mientras en el primero se trata de determinar directamente los compuestos de alteración que se encuentran en la linfa después de la administración de una determinada muestra, la digestibilidad establece la absorción de forma indirecta partiendo de los compuestos presentes en las heces de los animales experimentales.

A continuación se resume la información bibliográfica más relevante respecto a ambas formas de evaluación de la absorción, estudios que constituyen los antecedentes más directos del trabajo desarrollado en esta Tesis:

1.3.3.1.- EVALUACION DIRECTA DE LA ABSORCION INTESTINAL

La determinación directa de las tasas de absorción requiere la canulación previa de los animales en el canal linfático (158) (159) y el análisis posterior de la linfa recogida.

Los estudios más interesantes en esta línea han sido realizados por el equipo que dirige E. G. Perkins en la Universidad de Illinois, a lo largo de 10 años. La importancia de estos estudios reside en que han sido abordados de forma sistemática para diferentes grupos de compuestos, utilizando en muchos casos productos de síntesis o aislados con un elevado grado de pureza, lo que permite, al menos, establecer una comparación para los compuestos estudiados. Por otra parte, reconoce desde el primer momento la dificultad de cuantificar los compuestos absorbidos en el fluido linfático y, por ello, utiliza marca

dores radiactivos, evaluando la absorción por la medida de la radiactividad presente en la linfa.

En los primeros estudios se determina la absorción de ácidos oxidados (12-ceto y 12-hidroxi-10-octadecenoato de metilo) que son característicos entre los compuestos de oxidación de las grasas (160) (161). El análisis de la linfa indica una tasa de absorción elevada para ambos, aproximadamente un 70%, y una baja velocidad de absorción, ya que después de 48 horas, una parte de la muestra ingerida permanece en el intestino.

Una vez conocida la fácil absorción de compuestos de oxidación monoméricos, los autores consideraron necesario abordar el estudio global de los compuestos que se originan en la termoxidación de las grasas, lo que permitiría determinar la cantidad mínima total de compuestos absorbibles. El estudio constituye un magnífico modelo de un buen planteamiento aunque sus resultados no permitieron alcanzar conclusiones relevantes (162).

En síntesis el estudio consistió en la termoxidación de un aceite de maíz al que previamente se había incorporado por transesterificación 1-¹⁴C -ácido linoleico. A partir de los ésteres metílicos del aceite termoxidado, la fracción no aductable con urea, que contiene todos los compuestos de degradación, fue administrada por intubación gástrica a los animales canulados y la linfa recogida durante 48 horas.

Los resultados indican la existencia de dos máximos de absorción a las 7 y 24 horas de la administración y una absorción cercana al 40%. En el posterior análisis cualitativo mediante cromatografía en capa fina y gas-líquido preparativa, se consiguió el aislamiento de 103 compuestos, de los cuales 25 fueron identificados como ácidos monoméricos y oxidados, y aldehidos y cetonas de cadena larga. No se comenta si la técnica utilizada permitía detectar componentes de peso molecular más elevado y menor volatilidad y, por ello, no se esta-

blecen conclusiones en relación con otros compuestos distintos de los ácidos oxidados monómeros.

Estudios posteriores se han dirigido a la evaluación de los compuestos que pueden obtenerse en mayor estado de pureza: dímeros cíclicos (163) (164), dímeros no cíclicos (144) y monómeros cíclicos (112) (134).

En el caso de ambos tipos de dímeros no polares, los resultados demuestran que, después de 48 horas, en todos los casos permanecen en el intestino cantidades significativas de compuestos y que, por tanto, los resultados de absorción pueden estar infravalorados. No obstante, la cantidad de radiactividad encontrada en la linfa es muy baja, no superior al 5%. Los monómeros cíclicos, sin embargo, se absorben con facilidad, ya que aproximadamente el 60% de la dosis administrada se recupera en las 48 horas del ensayo y el resto fue encontrada en el tracto intestinal.

En estos estudios, la muestra administrada a los animales experimentales eran los ésteres metílicos de los compuestos citados, y no puede excluirse la posibilidad de que la absorción sea menor en estos casos debido a la naturaleza de la muestra. De hecho, los ésteres metílicos de ácidos grasos normales no son absorbidos tal cual, ni siquiera cuando se mezclan con triglicéridos para favorecer su solubilización en el lumen intestinal (165) y además, su hidrólisis por la lipasa pancreática es considerablemente más baja que la de los correspondientes triglicéridos (166-168).

Teniendo en cuenta estos hechos, merecen especial atención los estudios desarrollados por Combe et al. (169) (170) para definir la absorción de diferentes grupos de compuestos no volátiles presentes en grasas termoxidadas, así como de triglicéridos sintéticos conteniendo un ácido monómero alicíclico o aromático de estructuras definidas. En relación con los productos de termoxidación no volátiles, los resultados obtenidos de forma similar a la anteriormente descrita en

cuanto al periodo analizado -48 horas-, indican una absorción del 4% para los compuestos de polimerización, 53% para los ácidos monómeros oxidados y 96% para los monómeros cíclicos de origen térmico. La determinación de los compuestos se realiza por densitometría, después de la separación de los ésteres metílicos mediante cromatografía en capa fina y, aunque desde el punto de vista cuantitativo la evaluación resulta muy dudosa, el estudio tiene el inestimable valor de proporcionar datos sobre los compuestos de oxidación no monoméricos.

No se han descrito posteriormente otros estudios relacionados con esta línea concreta e incluso es bastante sintomático que los últimos estudios del primer grupo de trabajo citado (134)(144) dentro de la misma línea, elimina el paso de canulación de los animales para controlar la radiactividad presente en órganos y tejidos, orina, heces y CO₂ expirado después de la intubación gástrica de la muestra. Esta nueva orientación puede deberse a las múltiples dificultades de estos estudios que, como síntesis, se resumen a continuación:

- 1.- A las 48 horas de administración de la muestra, que es el periodo considerado en todos los estudios, aún quedan compuestos en el intestino con posibilidad de ser absorbidos.
- 2.- Estudios realizados manteniendo en paralelo ratas no canuladas a las cuales se administra la misma muestra, demuestran que la radiactividad total encontrada en órganos, tejidos, orina y CO₂ expirado es muy superior, en el caso de los dímeros, a la radiactividad detectada en la linfa. Puesto que sólo es explicable la existencia de esa radiactividad si ha existido absorción, el resultado es una prueba indirecta de la deficiencia de la técnica utilizada.
- 3.- La imposibilidad de una buena cuantificación de los compuestos de oxidación resta valor a los resultados, mientras que los únicos compuestos con posibilidad de ser preparados con un grado de pure-

za suficiente y que son más fáciles de determinar, no son representativos de los compuestos ingeridos.

- 4.- Finalmente, los propios autores sugieren en uno de los estudios (164) que es posible que la absorción de estos compuestos sea muy diferente cuando la muestra se suministra por intubación que cuando constituye una pequeña porción de la dieta conteniendo proteínas y carbohidratos, lo que indica que dan más valor a los resultados cuando se administra a los animales una dieta completa.

1.3.3.2.- EVALUACION DE LOS LIPIDOS NO ABSORBIDOS

Como ya se ha comentado, la determinación cuantitativa de compuestos no absorbidos es una medida alternativa indirecta de los compuestos que han desaparecido en el tracto intestinal. Su cálculo es sencillo una vez determinadas, durante el periodo establecido, las cantidades de compuestos ingeridos y excretados, y la fórmula más usual es la que expresa el porcentaje de compuesto teóricamente absorbido:

$$\text{Digestibilidad} = \frac{\text{Compuesto ingerido} - \text{Compuesto excretado}}{\text{Compuesto ingerido}} \times 100$$

El resultado obtenido depende fundamentalmente de dos factores:

- 1.- La exactitud en la evaluación de las cantidades de dieta consumida y de heces excretadas lo que, como es bien conocido, se realiza utilizando jaulas metabólicas que permiten un riguroso control.
- 2.- La posibilidad de cuantificar los compuestos de interés tanto en la dieta como en las heces de los animales experimentales, lo cual

es relativamente sencillo en el caso de la grasa total y más problemático cuando se trata de evaluar grupos de compuestos específicos.

No es extraño, por tanto, que desde que el control de las cantidades ingeridas y excretadas es posible, se iniciaran, en las grasas termoxidadas, estudios dirigidos a conocer la digestibilidad de la grasa total utilizando para la preparación de la grasa de la dieta de los animales experimentales, fundamentalmente ratas, todas las posibilidades descritas en la Tabla III.

La revisión realizada por Artman en 1969 con el título "Propiedades químicas y biológicas de las grasas calentadas" (2) resume de forma inmejorable los estudios realizados durante los años 50 y 60 que muestran que los clásicos estudios realizados por Kaunitz (116-121) y Crampton et al. (128-130) establecieron las principales bases que aún siguen vigentes:

- 1.- La digestibilidad disminuye con el incremento de la alteración de la grasa.
- 2.- La disminución de digestibilidad está directamente relacionada con el incremento de la fracción concentrada en ácidos grasos no destitable y no aductable con urea (88) (149).

Estudios realizados con posterioridad confirman estos resultados que hacen recaer la disminución de la absorción de la grasa en la fracción más polimérica, lo que por otra parte es explicable si se considera, comparativamente, el aumento del peso molecular de la molécula y la necesidad de hidrólisis previa de los triglicéridos para disminuir su peso y tamaño molecular.

En relación con las grasas utilizadas en fritura, los resultados obtenidos son mucho más atenuados, llegando incluso a no ser

apreciada la diferencia de digestibilidad con el aceite no calentado (171).

Especial interés merecen los estudios realizados con compuestos purificados porque permiten, además, establecer una comparación de resultados con los obtenidos mediante análisis del fluido linfático. No se ha encontrado ningún estudio que haga referencia a la cuantificación en heces de los monómeros cíclicos ya que dadas sus elevadas tasas de absorción se encontrarían como componentes muy minoritarios. Sin embargo, la digestibilidad aparente de los dímeros, donde se da la circunstancia inversa, muestra valores comprendidos entre el 30 y el 70% (172-174), aunque tan elevadas tasas de absorción han sido muy cuestionadas (175) (176).

Las tasas de digestibilidad, en general, son poco concordantes con las tasas de absorción obtenidas por vía directa, sin que existan particulares razones para dar preferencia a unos resultados sobre otros, mientras no se garantice la reproducibilidad de las técnicas analíticas utilizadas para la cuantificación en ambos casos, o mientras no existan estudios que evalúen en el mismo animal la tasa de absorción por los dos caminos alternativos.

La conclusión más significativa de este apartado es la necesidad de disponer de técnicas analíticas adecuadas para la separación y cuantificación de compuestos de alteración que permitan mejorar los resultados obtenidos y realizar estudios para conocer las tasas de absorción de los compuestos más característicos de la alteración termoxidativa.

Por encima de las divergencias existentes en los resultados de los distintos estudios, se pueden establecer algunas conclusiones de carácter general, relacionadas con los resultados obtenidos, las causas de las divergencias y las deficiencias en los planteamientos, que se resumen a continuación:

- 1.- Los resultados obtenidos en animales experimentales alimentados con grasas de fritura en dosis elevadas no son alarmantes ya que, en general, no se observan diferencias significativas con las grasas no calentadas. En los casos en que se deduce alguna consecuencia nutricional, los efectos observados se refieren a la disminución de la eficacia alimentaria y la digestibilidad de la grasa, justificada por una menor absorción relacionada con los compuestos de polimerización.
- 2.- Por el contrario, está bien establecido que las grasas sometidas a condiciones termoxidativas drásticas pueden ser tóxicas para los animales experimentales, sobre todo en las siguientes circunstancias:
 - a) Grasas ricas en ácidos grasos poliinsaturados y, más específicamente, en ácido linolénico.
 - b) Temperatura muy elevada y condiciones de oxidación favorecidas.

c) Animales experimentales muy jóvenes o sometidos a dietas deficientes en nutrientes.

- 3.- Los compuestos de toxicidad más elevada son los ácidos cíclicos obtenidos en condiciones de alteración puramente térmica a partir de grasas muy insaturadas. Tales compuestos, de elevada tasa de absorción, no se encuentran, sin embargo, en cantidades apreciables en las grasas utilizadas en la fritura de alimentos. Desafortunadamente, no ha sido posible obtener una información útil a partir de otros grupos de compuestos más característicos de la alteración termoxidativa, debido a dificultades analíticas de separación y cuantificación.
- 4.- Las divergencias en los resultados se deben fundamentalmente al elevado número de variables que influyen en la alteración termoxidativa, que impide la obtención de resultados reproducibles incluso en el mismo laboratorio. La definición de las grasas utilizadas en los estudios, que está basada en las variables insaturación inicial, temperatura, ausencia o presencia de aire y tiempo de calentamiento, es a todas luces insuficiente, ya que la igualdad de las variables citadas no asegura la identidad de la alteración conseguida.
- 5.- La mayor parte de los estudios se refieren a aspectos inespecíficos tales como disminución del crecimiento, modificación en el peso de órganos, mortalidad, digestibilidad, etc... sin que, incluso a partir de grasas termoxidadas en condiciones extremas o de compuestos específicos de demostrada toxicidad, se haya obtenido un conocimiento de los mecanismos o las causas por los que se originan los efectos negativos citados.

Teniendo en cuenta esta situación, derivada fundamentalmente de la complejidad de la mezcla de compuestos a evaluar, existe acuerdo entre los investigadores sobre la necesidad de replantear los estudios para establecer bases que permitan en el futuro un juicio más sólido sobre las propiedades biológicas de las grasas termoxidadas. La deducción de conclusiones de mayor profundidad y seguridad exigiría un conocimiento preciso de las cantidades de los diferentes grupos de compuestos originados, su dependencia de la naturaleza de la grasa y de las condiciones de tratamiento, la determinación de sus posibilidades de absorción y el establecimiento de investigaciones toxicológicas a corto, medio y largo plazo sobre los diferentes grupos de compuestos obtenidos por purificación de fracciones o por síntesis, administrados a diferentes dosis. Sólo a partir de este conocimiento, sería posible abordar finalmente la significación de los resultados obtenidos en relación con la práctica culinaria y establecer, si fuera necesario, normas objetivas para garantizar la salubridad de las grasas consumidas.

1.4.- OBJETIVOS DEL TRABAJO

En el Apartado 1.1. se resumía la importancia cuantitativa de las grasas consumidas después de haber sido sometidas a condiciones termoxidativas, relacionada fundamentalmente con la extensión del proceso de fritura como procedimiento de preparación de alimentos en los países desarrollados.

La nueva situación ha conducido al establecimiento de objetivos prioritarios en el área para solucionar los problemas derivados de las especiales características del proceso, que origina una degradación paulatina de la grasa de difícil evaluación y de consecuencias nutricionales controvertidas.

Entre los objetivos prioritarios destacan, sin duda, la búsqueda de grasas más estables y el establecimiento de normas o reglamentaciones que limiten el nivel de alteración en las grasas ingeridas. Ambos objetivos han impulsado al desarrollo de investigaciones analíticas para obtener un mejor conocimiento de los compuestos originados. Es hoy reconocido que, sin una buena definición de la grasa termoxidada, es imposible profundizar en estos aspectos y en otros de similar importancia como son la búsqueda de tratamientos para disminuir la alteración, o la obtención de resultados reproducibles en estudios nutricionales.

En este contexto, este estudio ha sido planteado con los siguientes objetivos concretos:

- 1) Establecer una nueva metodología analítica para la cuantificación de los principales grupos de compuestos formados, que permita conocer la alteración real de la grasa.
- 2) Definir, a partir de una buena sistemática analítica, las tasas de absorción de los compuestos más característicos originados en la alteración termoxidativa, para deducir, en su caso, los que tienen mayor probabilidad de afectar negativamente al valor nutricional de la grasa.
- 3) Contribuir al establecimiento de bases objetivas que permitan relacionar los niveles de alteración con las propiedades fisiológicas de las grasas termoxidadas.

El estudio realizado se ha subdividido en tres grandes apartados que se resumen en los siguientes puntos:

- 1.- Investigación de nuevos métodos analíticos que introducen una mejora significativa en la cuantificación de compuestos de alteración y permiten, por primera vez, una evaluación cuantitativa de las tres principales alteraciones - térmica, oxidativa e hidrolítica - que contribuyen a la degradación de las grasas.
- 2.- Estudio de las probabilidades de absorción de los grupos de compuestos más representativos presentes en grasas termoxidadas, resultando ser los compuestos originados por vía oxidativa los de mayor interés para estudios nutricionales posteriores.
- 3.- Desarrollo de experiencias específicas para explicar los resultados más significativos, que han permitido profundizar en puntos tan interesantes como la acción de la lipasa pancreática sobre moléculas complejas de triglicéridos, la influencia de la grasa de la dieta sobre los lípidos de origen endógeno y las posibilidades de modificación de moléculas alteradas durante el proceso de digestión.

2.- PARTE EXPERIMENTAL

**2.1.- DESARROLLO DE METODOS ANALITICOS PARA LA
CUANTIFICACION DE LA ALTERACION EN GRASAS
TERMOXIDADAS**

Los estudios previos relacionados con la determinación de la alteración en grasas termoxidadas pueden resumirse en dos puntos fundamentales:

- 1) Es posible en la actualidad determinar la alteración global producida en una grasa, utilizando métodos exactos y reproducibles (74). En tales métodos se parte de la grasa para evaluar la cantidad global de productos glicerídicos de alteración (79) o de derivados más simples, como los ésteres metílicos (85) (177), que permiten conocer los ácidos grasos que han experimentado alteración oxidativa y térmica.
- 2) Las determinaciones específicas de los compuestos o grupos de compuestos originados durante la termoxidación son más escasos, y están apoyados fundamentalmente en la cromatografía gas-líquido (178).

A nuestro juicio, las mejoras analíticas en este área deben partir de dos consideraciones de similar importancia, que se resumen a continuación:

- 1º) La necesidad de evaluar independientemente las tres alteraciones - térmica, oxidativa e hidrolítica - que han contribuido a modificar las características y propiedades de la grasa. El desconocimiento actual sobre el tema exige definir objetivos realistas entre los cuales el primero debería consistir en diferenciar los compuestos de alteración hidrolítica. Esta prioridad está justificada por la distinta vía de formación de estos compuestos y por su nula contribución a la modificación del valor nutricional de la grasa. La determinación de los compuestos de hidrólisis, por otra parte, debe realizarse directamente en la grasa, sin modificación previa al análisis.

- 2º) La necesidad de establecer nuevos métodos para evaluar los principales compuestos originados que contribuyen a disminuir las propiedades nutricionales y sensoriales de la grasa. A este respecto, son los ácidos grasos modificados por vía térmica u oxidativa los de mayor interés, y su exacta determinación exige previamente la hidrólisis o transesterificación de la grasa.

Los nuevos métodos analíticos que se desarrollan en este apartado responden a ambas ideas, combinando las posibilidades de evaluación directa de la grasa con el análisis de derivados más simples.

**2.1.1.- Determinación de compuestos de
alteración glicerídicos**

El objetivo fundamental planteado inicialmente en este estudio fue conseguir una determinación exacta y reproducible de los diglicéridos originados en la hidrólisis de la grasa. Ello permitiría conocer la importancia de la alteración hidrolítica y, por diferencia con la degradación total producida, se podría determinar la alteración termoxidativa.

Para ello era necesario utilizar como base la grasa total y tener en cuenta que la determinación basada en los grupos hidroxilos libres no era factible dada la alta probabilidad de encontrar estos grupos funcionales entre los ácidos grasos alterados.

La mejor posibilidad analítica teórica debería aprovechar la diferencia de peso molecular que tienen los diglicéridos con el resto de los compuestos de alteración y con los triglicéridos que permanecen sin alterar, lo que conduce directamente a utilizar como base de la determinación la cromatografía de exclusión.

Durante la década pasada y particularmente en los últimos años, se han examinado las posibilidades de la cromatografía de exclusión para la separación de compuestos alterados producidos durante el calentamiento de grasas (96) (97) (179) (180). El análisis es simple, pues sólo es necesario diluir la grasa en el disolvente apropiado antes de la determinación cromatográfica, pero la resolución obtenida

es muy pobre. Concretamente, los diglicéridos eluyen incluidos en el pico mayoritario correspondiente a los triglicéridos monoméricos, donde se encuentra toda la grasa que no ha sufrido aún alteración. La determinación de compuestos polares propuesta por la I.U.P.A.C. (181) para conocer la alteración total en muestras termoxidadas y de fritura, nos sugirió la posibilidad de solucionar este inconveniente al poder utilizar una fracción concentrada en los compuestos de interés.

El estudio que se describe a continuación utiliza, por tanto, la que, a nuestro juicio, es la mejor combinación de técnicas para la determinación de los citados compuestos. Los resultados obtenidos demuestran que las expectativas fueron ampliamente superadas, puesto que a partir de las separaciones conseguidas se deducen otras conclusiones de importancia en el análisis de grasas.

2.1.1.1. MUESTRAS UTILIZADAS

Para el estudio de las posibilidades de separación y cuantificación de compuestos polares se han utilizado compuestos puros y muestras de grasa, no calentadas y termoxidadas, que se detallan a continuación:

a) Compuestos de pureza cromatográfica superior al 99%

1.- Diglicéridos puros:

- * Dipalmitina
- * Dioleína
- * Dilinoleína

- * Dos muestras de diglicéridos mixtos obtenidos a partir de grasas comestibles de distinto grado de insaturación.

2.- Triglicéridos puros:

- * Tripalmitina
- * Trioleína
- * Trilinoleína

- * Dos muestras de triglicéridos mixtos aislados a partir de grasas comestibles de distinto grado de insaturación.

Estas muestras han sido utilizadas para definir las mejores condiciones de separación en cromatografía de exclusión y para conocer las variaciones en los factores de respuesta de los dos grupos de compuestos.

b) Muestras de compuestos polares presentes en grasas no calentadas y sometidas a condiciones termoxidativas, utilizadas con el objetivo de conocer los resultados obtenidos en muestras reales de composición desconocida y modificar, en su caso, los parámetros estable

cidos, para obtener la mejor separación de los componentes de la muestra.

c) Muestras de aceite de oliva y girasol utilizadas en los posteriores ensayos con animales experimentales, cuyas variables de tratamiento más relevantes se resumen a continuación:

- 1.- Aceites de oliva y girasol refinados no calentados y termoxidados durante 100 horas - 10 periodos de 10 horas - a 190°C.
- 2.- Aceites de oliva puro no calentado y termoxidado durante 150 horas - 10 periodos de 15 horas - a 190°C, así como una mezcla de ambos al 50%.

Estas muestras, cuyas características generales se detallan en la Tabla IV, han sido cuantificadas por cuadruplicado, una vez definidas las mejores condiciones de aplicación del método.

	OLIVA REFINADO		GIRASOL REFINADO		OLIVA PURO			
	No calentado	Termoxidado 100 horas	No calentado	Termoxidado 100 horas	No calentado ⁽¹⁾	Mezcla al 50% de (1) y (2)	Termoxidado ⁽²⁾ 150 horas	
- ACIDEZ (182) (% oleico)	0,13	0,86	0,18	0,65	0,31	0,40	0,58	
- INDICE DE PEROXIDOS (183) (mg/Kg)	2,2	5,1	5,0	6,2	7,5	3,6	1,7	
- ESTABILIDAD (184) (horas)	21,2	14,0	9,2	6,0	23,3	13,4	10,6	
COMPOSICION EN ACIDOS GRASOS (%) (185)	C _{16:0}	10,8	16,7	8,2	12,1	11,1	13,3	15,5
	C _{16:1}	0,9	0,8	-	-	1,0	0,8	0,9
	C _{18:0}	2,4	4,4	5,0	7,7	3,7	4,3	5,3
	C _{18:1}	78,3	76,5	27,8	33,9	76,8	75,8	75,6
	C _{18:2}	7,6	1,6	59,0	46,3	7,4	5,8	2,7

Tabla IV.- Características generales de los aceites utilizados

2.1.1.2.- ENSAYOS PREVIOS : SELECCION DE CONDICIONES CROMATOGRAFICAS

Para este estudio se ha utilizado un cromatógrafo líquido KONIK 500 A.

1) SISTEMAS DE DETECCION

Se han utilizado 2 detectores conectados en serie:

- 1º) Detector de Índice de Refracción (HP-1037A)
- 2º) Detector de absorción UV (ERC-7211), en el que se ha seleccionado una longitud de onda de 232nm, a la que tiene lugar la mayor respuesta para los componentes de la muestra.

2) FASE FIJA

Se ha seleccionado la fase fija más clásica, para obtener una separación de la muestra basada en el tamaño molecular: copolímeros de estireno y divinilbenceno. Se han ensayado 2 columnas de 30cm de longitud y 0,77cm d.i., de partículas de 10 μ m y tamaño de poro de 100 y 500Å, que permiten una separación teórica en el rango de pesos moleculares de 300 a 5000 y de 1000 a 10000, respectivamente.

La eficacia de la separación se determinó utilizando ambas columnas independientemente y conectadas en serie.

3) FASE MOVIL

El detector de Índice de Refracción obliga a utilizar un régimen isocrático e incluso, en nuestro caso, un disolvente puro, ya que no se consiguió una buena estabilidad del sistema cromatográfico con la mezcla cloroformo-metanol, que fue la primera seleccionada. Por ello, los disolventes ensayados han sido tolueno y tetrahidrofurano, que son los más apropiados para la separación de muestras de lípidos

(96) (179) (180). Aunque en ambos casos se consigue una buena sensibilidad, la elección final del tetrahidrofurano se basó en la mejor solubilidad de las muestras.

4) FLUJO

El rango de flujos estudiado ha sido de 0,2 - 2ml/min, encontrándose la mejor eficacia de la separación entre 0,2 y 0,7ml/min cuando se utiliza una sola columna.

Se ha seleccionado un flujo de 0,5ml/min, que permite realizar la separación en 20 min cuando se utiliza una sola columna y en 35 min cuando ambas columnas se utilizan en serie.

— RESULTADOS Y DISCUSION —

En la Figura 5 se recogen 3 cromatogramas representativos de una muestra de grasa termoxidada, sometida a hidrólisis enzimática previa, para que contenga toda la gama de compuestos con posibilidades de separación. El análisis cromatográfico se ha realizado con la fase móvil y condiciones de flujo descritas previamente. Puede observarse, comparativamente, la resolución obtenida cuando las columnas se utilizan individualmente y conectadas en serie. La columna de menor tamaño de poro tiene una buena resolución para los compuestos de menor peso molecular, pero no permite separar adecuadamente compuestos de pesos moleculares superiores a los triglicéridos. La situación inversa se consigue con la columna de mayor tamaño de poro, mientras la mejor resolución se obtiene cuando ambas columnas se utilizan conjuntamente.

Por otra parte, en la misma figura se recoge la resolución obtenida utilizando ambos sistemas de detección, de cuya comparación se deduce claramente la imposibilidad de utilizar con fines

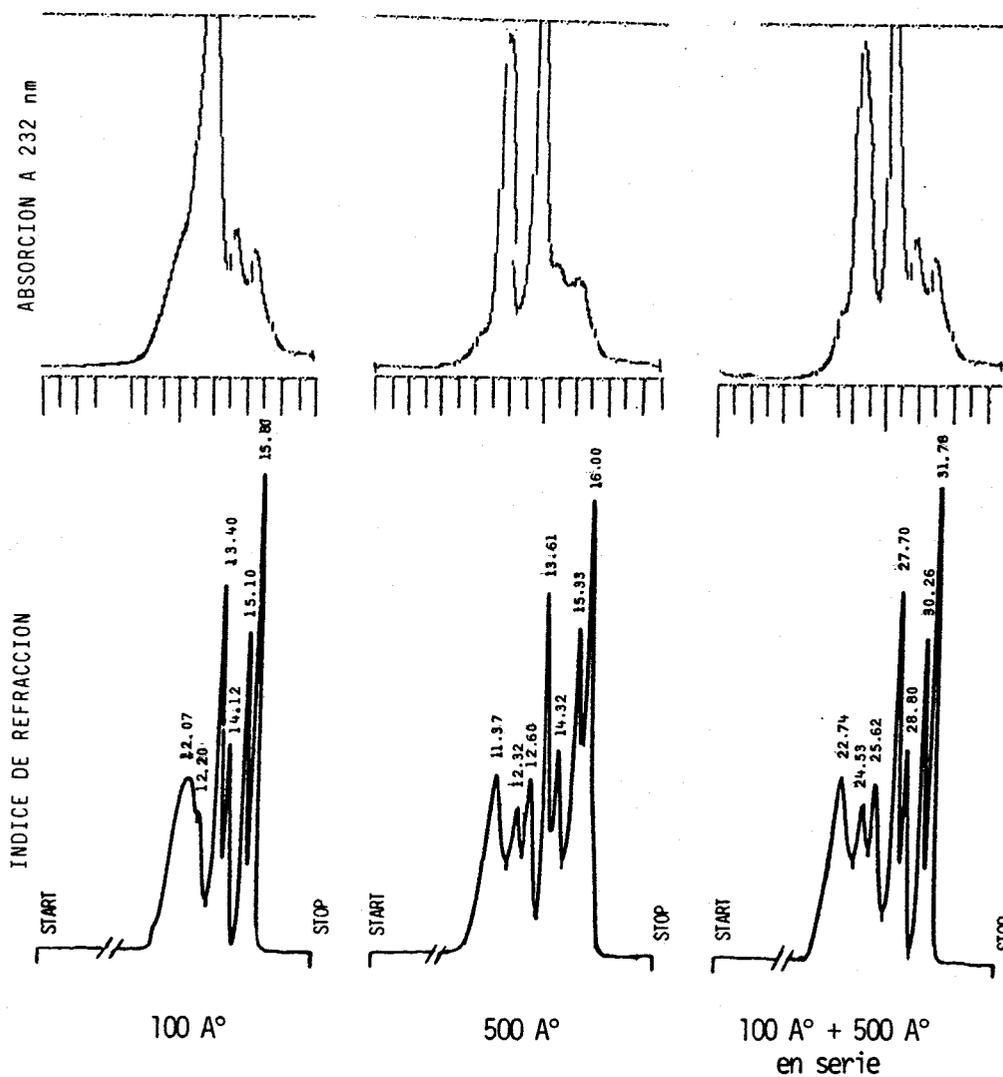
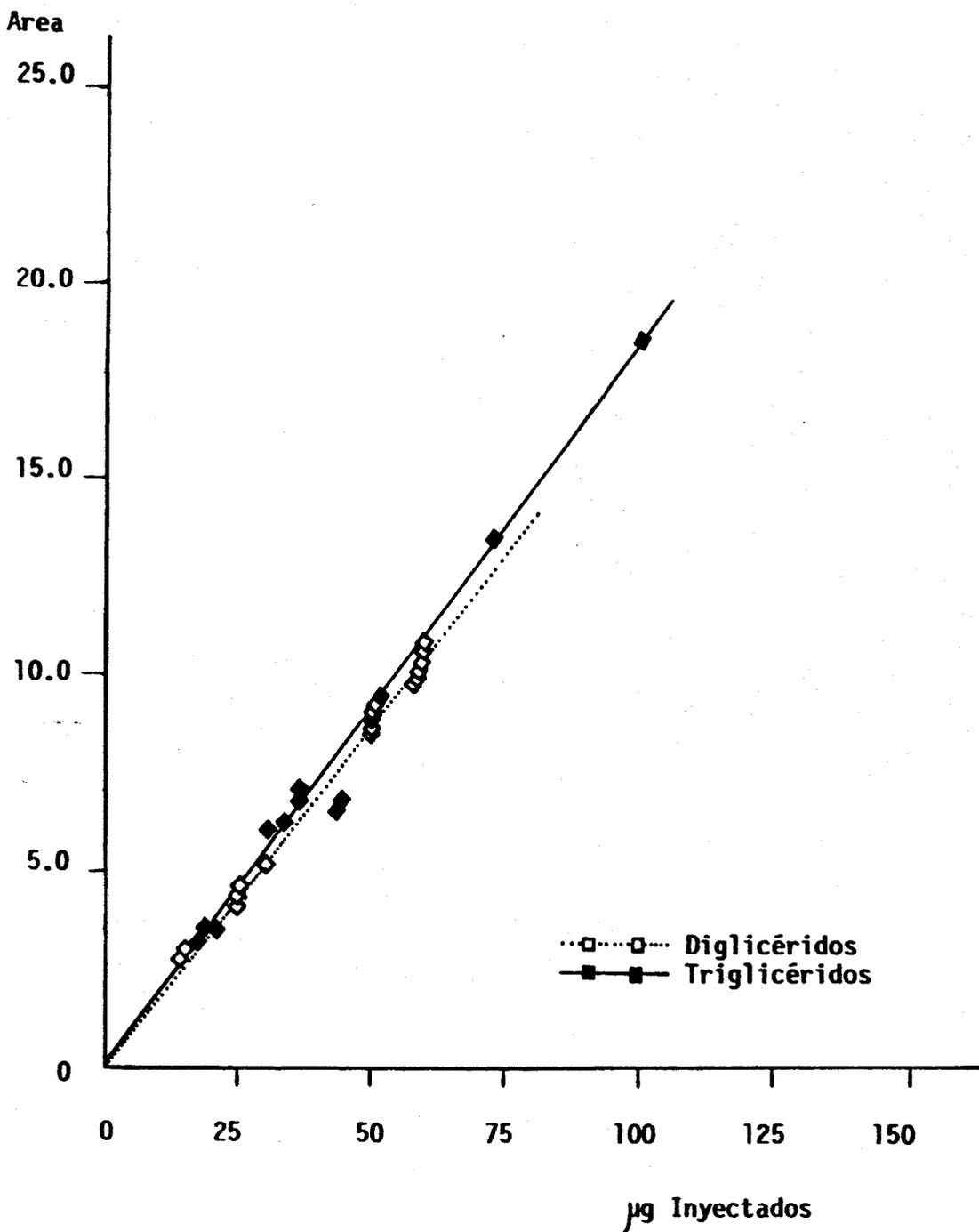


Figura 5.- Eficacia de las separaciones obtenidas con distintas columnas cromatográficas.

cuantitativos la absorción en la región ultravioleta. En efecto, la absorción a la longitud de onda más sensible depende de la existencia de dobles enlaces conjugados en la molécula y, por ello, no es posible obtener respuesta significativa para aquellos grupos de compuestos constituidos por ácidos grasos no alterados. Además, la presencia aleatoria de ácidos conjugados en moléculas alteradas hace sospechar que la intensidad de la respuesta debe depender muy estrechamente de la composición en ácidos grasos del aceite o grasa sometido a termoxidación. En conclusión, este sistema de detección ha sido desechado en estudios posteriores.

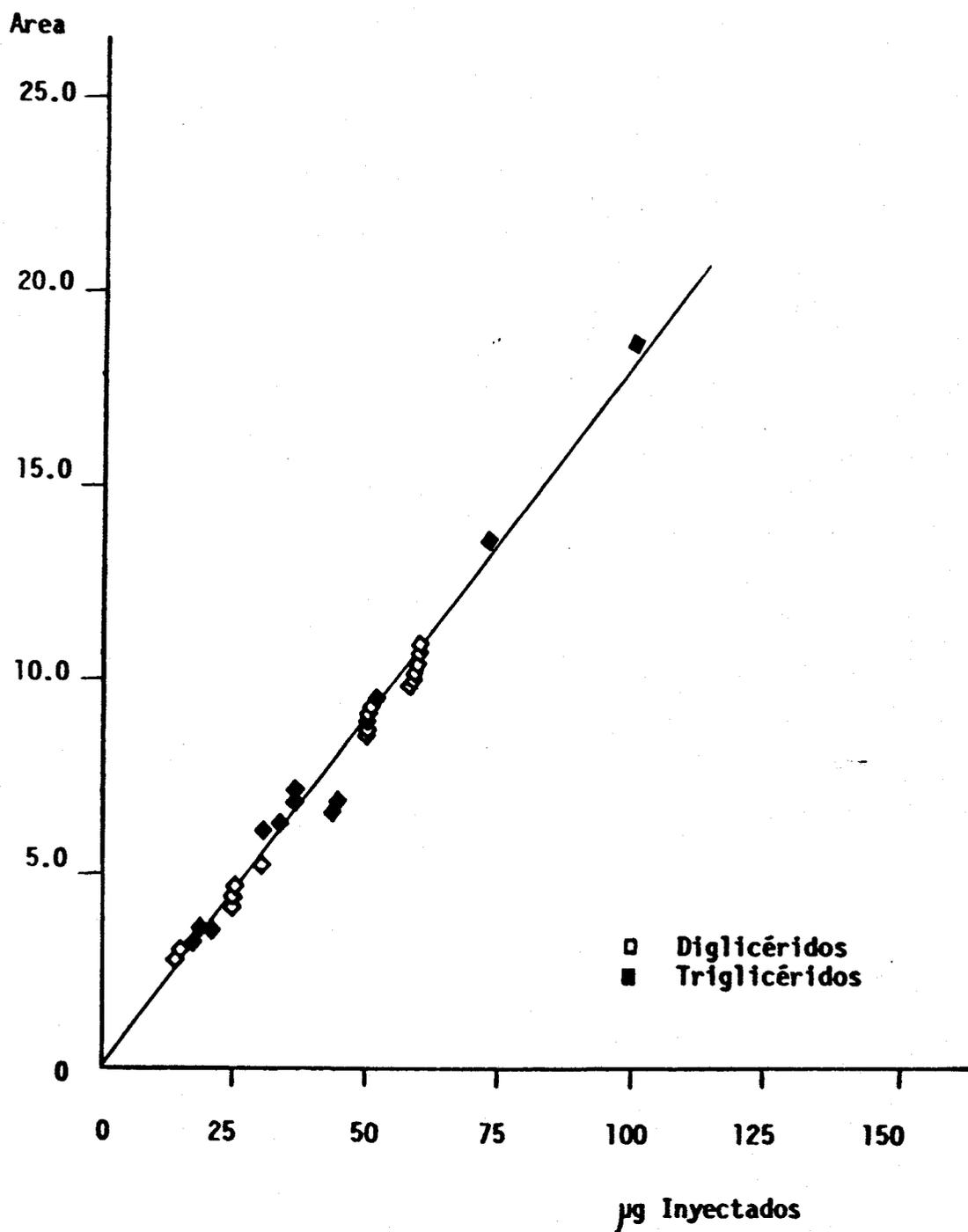
En la Figura 6 se representan las curvas de calibrado obtenidas para los triglicéridos y diglicéridos, utilizando 3 soluciones de cada una de las 5 muestras que se detallan en el apartado 2.1.1.1. Las ecuaciones de las rectas, coeficientes de correlación y número de determinaciones se detallan en la misma figura.

Aunque podrían utilizarse factores independientes para los dos grupos de compuestos, a partir de la recta global calculada con todos los datos, que se muestra en la Figura 7, se puede deducir que los valores obtenidos al utilizar una única calibración para todos los compuestos no son significativamente distintos a los que se encuentran utilizando las rectas específicas para cada grupo de compuestos (Fig.6). Por ello, la concentración de los distintos componentes de la muestra se ha calculado asumiendo un factor de respuesta similar para los componentes presentes.



	Ecuación de la recta	r	n
Diglicéridos	$y = 0.039 + 0.172 x$	0.9762	15
Triglicéridos	$y = 0.030 + 0.169 x$	0.9970	15

Figura 6.- Rectas de calibrado para diglicéridos y triglicéridos de distinto grado de insaturación.



Ecuación de la recta	r	n
$y = - 0.037 + 0.171 x$	0.9828	30

Figura 7.- Recta de calibrado global para diglicéridos y tri glicéridos.

2.1.1.3.- PROCEDIMIENTO ANALITICO

Los resultados obtenidos en los ensayos previos han conducido a proponer para la cuantificación individual de los principales grupos de compuestos polares el procedimiento analítico que se describe a continuación y que se encuentra esquematizado en la Figura 8, en el cual se incluye:

a) Determinación de compuestos polares mediante cromatografía en columna

Se sigue el método propuesto por la I.U.P.A.C. con dos leves modificaciones:

- El uso de hexano:éter etílico 90:10 para eluir la fracción no polar, pues se obtiene una mejor separación.

- Una elución final de la columna con cloroformo:metanol 2:1 para mejorar la recuperación de la muestra.

Material y reactivos

- * Columna de vidrio de 45 cm de altura, 2,5 cm de d.i. y llave de teflón
- * Silicagel 60 (70-230 mallas, Merck).
Se seca en una estufa a 160°C durante 4 horas y se enfría en un desecador a temperatura ambiente, ajustándose el contenido de agua al 5%.
- * Disolventes: hexano, éter etílico, cloroformo, metanol, reactivos para análisis.
- * Arena de mar, reactivo para análisis.
- * Placas para cromatografía.

Preparación de la columna

Se pesan en un matraz 25g de silicagel y se añaden 80 ml de hexano:éter 90:10. La mezcla se transfiere a la columna en cuyo fondo se ha colocado un tapón de lana de vidrio, eliminándose el disolvente en exceso sin que en ningún momento deje de cubrir la sílice y agregándose, finalmente, 2 g de arena de mar para facilitar la posterior fijación de la muestra.

Procedimiento operatorio

Una cantidad exactamente pesada de 2,5 g de muestra se ponen en un matraz aforado de 50 ml, que se enrasa con la mezcla de hexano:éter. De esta disolución se toman con una pipeta 20 ml que se transfieren a la columna.

Los componentes no polares se eluyen con 150 ml de hexano:éter 90:10 y se recogen en un matraz de 250 ml pesado con exactitud del mg, ajustándose el flujo para que los 150 ml pasen a través de la columna en 60-70 minutos.

Después de la elución, se lava cuidadosamente la salida de la columna para eliminar cualquier resto de la muestra.

La elución de los componentes polares se realiza con 150 ml de éter y 100 ml de cloroformo:metanol 2:1 y se recogen en otro matraz previamente tarado. El disolvente de ambas fracciones se elimina utilizando un rotavapor con baño de agua a 60°C, bajo corriente de nitrógeno. Una vez evaporado el disolvente, se determinan gravimétricamente ambas fracciones.

Eficacia de la separación

Cada una de las fracciones no polar y polar obtenidas se diluyen al 10% en cloroformo. Se aplican 10 μ l en una placa de silicagel de 0,25 mm de espesor y se eluye con hexano:éter:acético 80:20:1. La visualización de las manchas se realiza con vapores de yodo o pulverizando con SO_4H_2 al 50% y posterior carbonización.

b) Determinación cuantitativa de compuestos polares mediante cromatografía líquida de exclusión

Se pesa una cantidad de compuestos polares comprendida entre 50 y 100 mg, con exactitud del mg, en un matraz aforado de 5 ml, que se enrasa a continuación con tetrahidrofurano. Las muestras así preparadas se han analizado en un cromatógrafo líquido KONIK 500A utilizando las siguientes condiciones:

- * Columnas de Ultrastyrigel de 100 y 500 Å conectadas en serie, de 30 cm de longitud y 7,5 mm de d.i.
- * Muestra inyectada: 10 μ l
- * Fase móvil: Tetrahidrofurano
- * Flujo: 0,5 ml/min
- * Detector de Índice de Refracción (HP-1037A)

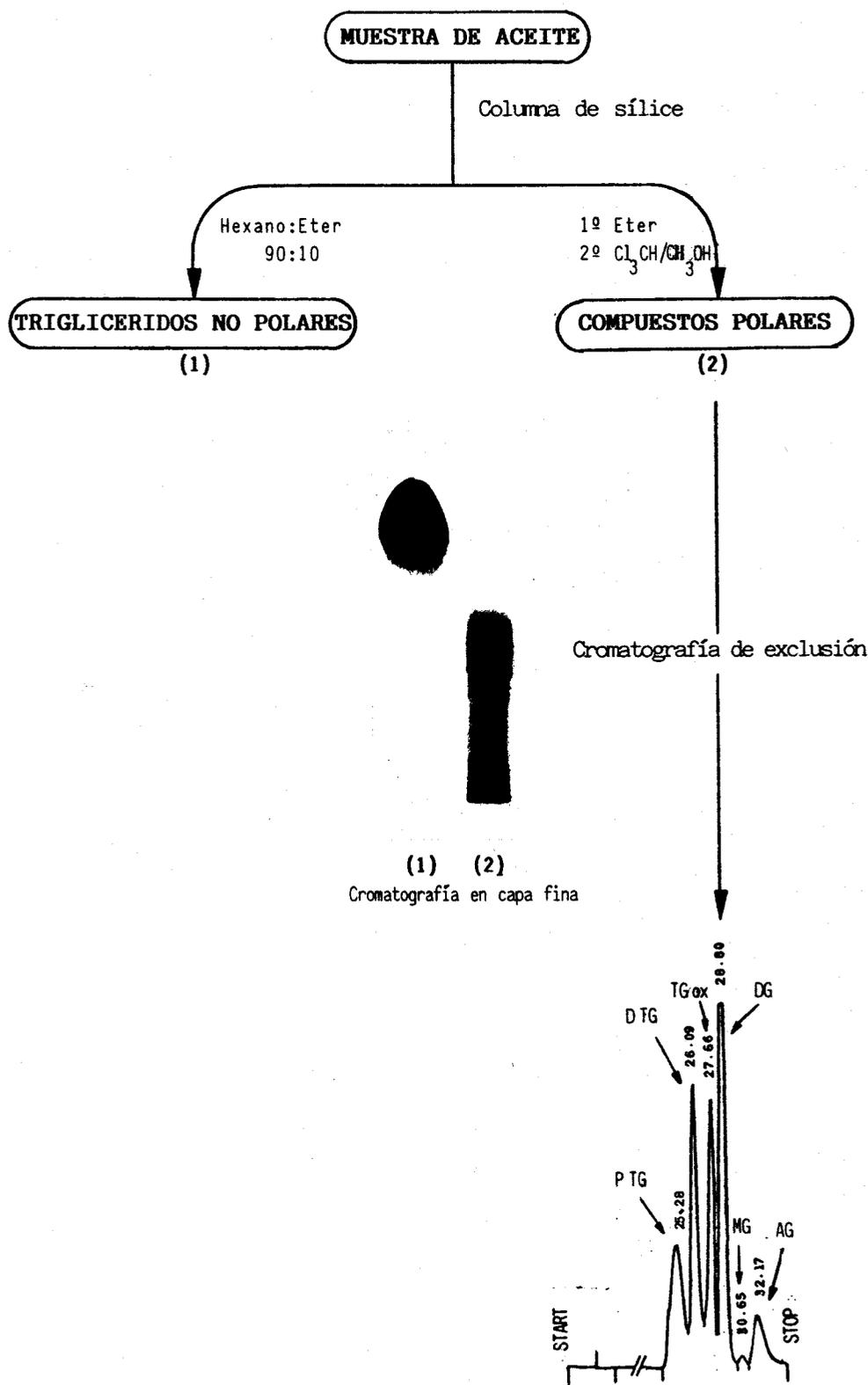


Figura 8.- Esquema general del procedimiento analítico utilizado.

— RESULTADOS Y DISCUSION —

La Tabla V muestra los resultados cuantitativos obtenidos para las muestras de aceites de oliva y girasol utilizadas en los estudios nutricionales posteriores, junto con los límites de confianza (95%) para la media de 4 determinaciones independientes en cada caso. En las 2 primeras filas se muestran los resultados obtenidos en la primera separación mediante cromatografía en columna de sílice y, en el resto, se indica la distribución de compuestos polares en grupos de diferente peso molecular, cuantificados mediante cromatografía líquida de exclusión. Como puede observarse, se ha superado el objetivo perseguido, que era inicialmente la determinación de la alteración hidrolítica, puesto que el procedimiento desarrollado permite determinar, además, varios grupos de compuestos de características bien definidas, originados por la acción del oxígeno y la temperatura.

Al margen de la buena reproducibilidad de las determinaciones, la exactitud de la cuantificación queda reflejada en los resultados obtenidos para la muestra de aceite de oliva que ha sido preparada pesando iguales cantidades de los aceites fresco y termoxidado, ya que los resultados medios encontrados no son significativamente distintos de los valores medios teóricos que tendría la mezcla al 50%.

Junto a los resultados cuantitativos que proporciona la metódica analítica desarrollada, es interesante destacar las ventajas del procedimiento frente a las determinaciones existentes previamente, y las posibilidades que ofrece en el análisis de componentes menores presentes en grasas no calentadas.

En efecto, las Figuras 9 y 10 muestran los cromatogramas obtenidos para la muestra total y para los compuestos polares en los dos casos extremos de evaluación: una grasa no calentada y una grasa termoxidada. En ambos casos, el primer cromatograma corresponde a la inyección directa de la muestra, y el segundo a los compuestos

	OLIVA REFINADO				GIRASOL REFINADO				OLIVA PURO					
	No calentado		Termoxidado 100 horas		No calentado		Termoxidado 100 horas		(1) No calentado		Mezcla al 50% de (1) y (2)		(2) Termoxidado 150 horas	
	\bar{x}^*	$tS_{\bar{x}}^*$	\bar{x}	$tS_{\bar{x}}$	\bar{x}	$tS_{\bar{x}}$	\bar{x}	$tS_{\bar{x}}$	\bar{x}	$tS_{\bar{x}}$	\bar{x}	$tS_{\bar{x}}$	\bar{x}	$tS_{\bar{x}}$
TRIGLICERIDOS NO ALTERADOS	94,9	0,48	28,8	0,63	95,2	0,60	20,9	0,92	95,5	0,76	62,7	0,83	31,5	0,57
COMPUESTOS POLARES :	5,2	0,48	69,9	0,52	4,8	0,60	77,2	0,67	4,5	0,76	37,1	1,01	67,2	1,11
- Polímeros	n.d.		18,40	1,91	n.d.		36,10	3,34	n.d.		17,59	1,81	33,47	2,38
- Dímeros	0,71	0,13	20,40	1,43	1,20	0,13	30,30	1,91	0,31	0,03	8,30	0,48	15,60	1,69
- Monómeros	1,08	0,38	26,30	2,25	1,59	0,18	7,60	0,64	1,58	0,31	7,70	0,60	13,80	0,62
- Diglicéridos	3,21	0,35	4,80	0,32	1,92	0,19	3,20	0,54	2,31	0,44	3,30	0,57	4,33	0,57
- Ácidos grasos	0,21	0,03	n.d.		0,17	0,03	n.d.		0,34	0,04	0,21	0,12	n.d.	

* Media de 4 determinaciones en cada caso (t= 3,182)

n.d.: no detectable

Tabla V.- Determinación cuantitativa de componentes glicéricos en los aceites de oliva y girasol

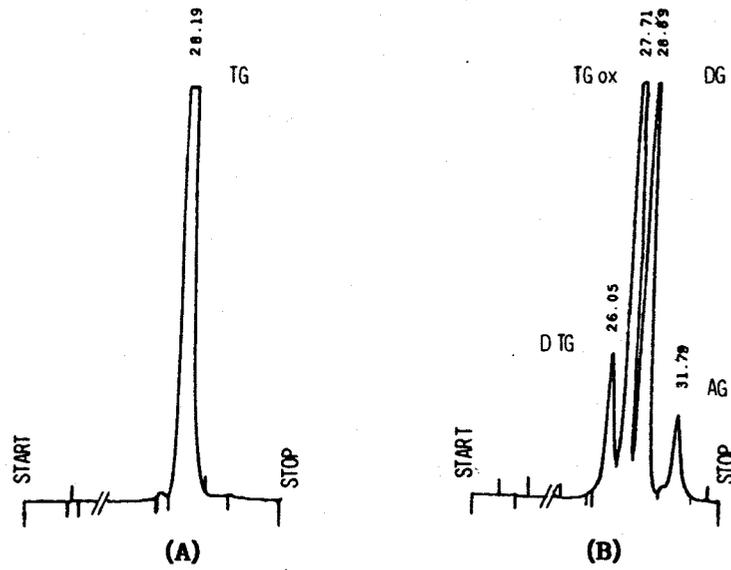


Figura 9.- Cromatogramas representativos de aceite de oliva no calentado: grasa total (A) y, com puestos polares.(B).

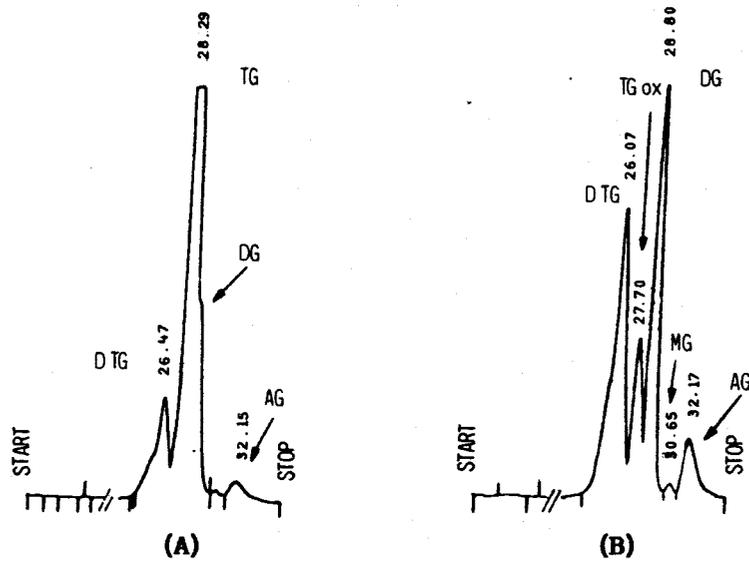


Figura 10.- Cromatogramas representativos de aceite de oliva termoxidado 150 horas: grasa total (A) y compuestos polares (B)

polares previamente separados mediante cromatografía en columna.

Las principales ventajas que aporta la separación previa de los compuestos polares por cromatografía en columna, en comparación con el análisis de la muestra de grasa total son las siguientes:

- 1º) Un aumento sustancial en las posibilidades de cuantificación de todos los grupos de compuestos de alteración, debido al efecto de concentración de la muestra.
- 2º) La determinación independiente de los triglicéridos monómeros oxidados, que eluyen al mismo tiempo que los triglicéridos no alterados. La cantidad de triglicéridos monómeros oxidados en la muestra constituye una medida de la alteración oxidativa producida, ya que estos compuestos se originan exclusivamente en presencia de oxígeno.
- 3º) La posibilidad de determinar los diglicéridos, que, en el caso de utilizar la muestra de grasa total, solapan con el pico predominante de los triglicéridos. La cuantificación de los diglicéridos permite la evaluación de la alteración hidrolítica, ya que estos compuestos permanecen en la grasa debido a su baja volatilidad mientras que los ácidos grasos originados al mismo tiempo, se pierden parcialmente durante el proceso, debido a la existencia de una elevada temperatura.

La Figura 11, por otra parte, refleja la importante aportación que supone la utilización de esta metodología analítica, como suplemento al método de la I.U.P.A.C., ya que muestra la posibilidad de diferenciar los distintos tipos de degradación en muestras con similares niveles de alteración total. Los cromatogramas corresponden a las fracciones alteradas de aceite de girasol (A) y de oliva (B) con el mismo nivel de compuestos polares ($\approx 30\%$). La aplicación de la cromatografía de exclusión revela la diferente composición de productos de

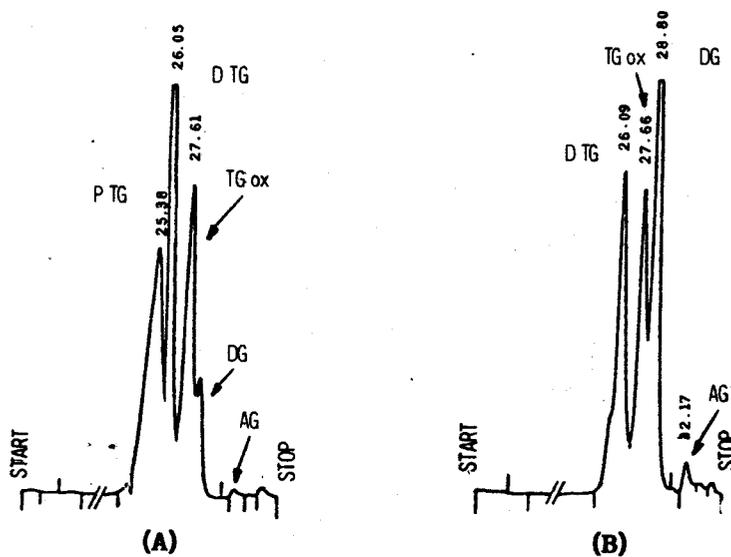


Figura 11.- Cromatogramas de fracciones polares de aceites de girasol (A) y oliva (B) con el mismo nivel de compuestos polares.

alteración: mientras que en el aceite de girasol destacan los compuestos característicos de las alteraciones oxidativa y térmica (polímeros, dímeros y triglicéridos oxidados), en el aceite de oliva predominan los compuestos característicos de la alteración hidrolítica (diglicéridos).

Es importante destacar en relación con este punto, que el procedimiento permite establecer diferencias "a priori" sobre la posible incidencia nutricional de grasas termoxidadas. Así, en este caso concreto, con iguales niveles de alteración total, el elevado grado de hidrólisis existente en el caso del aceite de oliva indicaría una menor consecuencia negativa de su ingestión y un mejor aprovechamiento digestivo del mismo.

Por último, al margen de las ventajas que supone el procedimiento propuesto para las grasas termoxidadas, su aplicación a muestras de grasas no calentadas contribuye a una mejor caracterización de éstas.

Un ejemplo de su aplicación para determinar la influencia de las condiciones de refinación de los aceites se encuentra reflejado en la Figura 12, en la que se recogen los cromatogramas correspondientes a las fracciones polares de aceite de oliva virgen (A) y aceite de oliva refinado (B).

Como puede observarse, el aceite de oliva virgen se caracteriza por la ausencia de dímeros de triglicéridos y la relación esperada ($\approx 2:1$) entre diglicéridos y ácidos grasos. Por otro lado, en el aceite de oliva refinado se observa la presencia de dímeros de triglicéridos y de una elevada relación diglicéridos/ácidos grasos, consecuencia de la pérdida de los ácidos grasos durante la refinación. Teniendo en cuenta estas diferencias, cualquier mezcla de ambos tipos de aceite resulta fácilmente detectable.

Al margen de esta aplicación, pueden determinarse las alteraciones oxidativa e hidrolítica en el mismo análisis mediante la

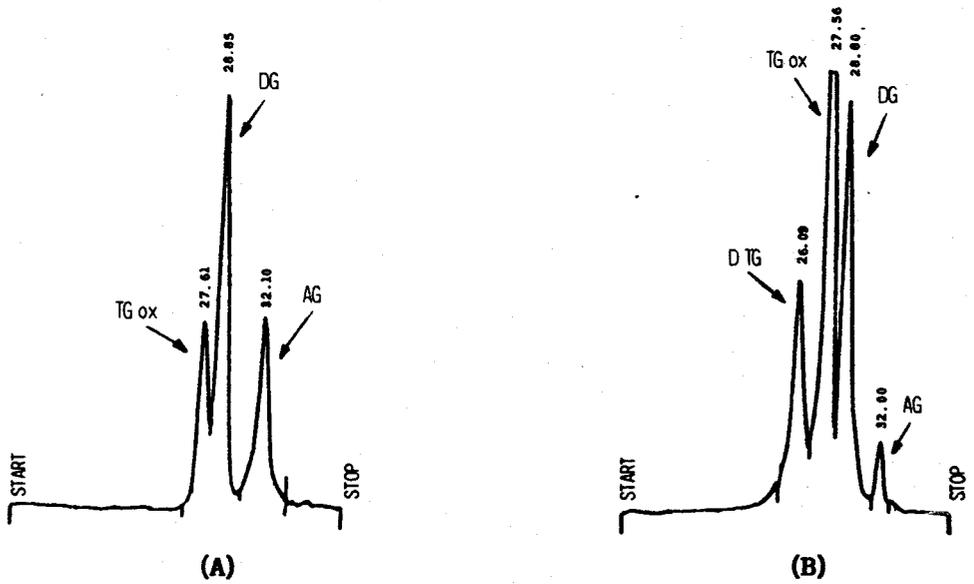


Figura 12.- Cromatogramas representativos de fracciones polares de aceite de oliva virgen (A) y refinado (B).

cuantificación de los triglicéridos oxidados totales y los diglicéridos, respectivamente.

El procedimiento sugiere, por tanto, una interesante alternativa a los índices analíticos actuales para la evaluación de la calidad de los aceites.

En resumen, el análisis propuesto en este estudio, que combina las técnicas de cromatografía en columna y cromatografía líquida de exclusión, y cuyo tiempo total de realización es inferior a las 3 horas, aporta importantes ventajas sobre las determinaciones existentes:

- 1º) Permite determinar cuantitativamente los grupos de compuestos más específicos de alteración: diglicéridos, triglicéridos oxidados, dímeros de triglicéridos y polímeros de triglicéridos.
- 2º) Permite obtener una evaluación global de la degradación producida y de las alteraciones contribuyentes.
- 3º) Puede ser aplicado a grasas no alteradas y abre interesantes posibilidades en lo que se refiere a la evaluación de la calidad de los aceites vírgenes y refinados, y a la determinación de modificaciones minoritarias originadas como consecuencia del procesado o almacenamiento.

**2.1.2.- Determinación de ácidos monómeros,
dímeros y polímeros**

En el apartado anterior se han descrito las posibilidades que ofrece la combinación de técnicas cromatográficas propuesta, para la evaluación de la degradación total y de las alteraciones contribuyentes en las grasas termoxidadas. Sin embargo, no puede ser ignorado que tal metodología no permite conocer las cantidades de ácidos grasos alterados existentes en una muestra, debido a la estructura molecular de los triglicéridos.

Efectivamente, la fracción polar evaluada contiene todos los compuestos de mayor polaridad que los triglicéridos no alterados y, dentro de ella, se encuentra una elevada proporción de ácidos no alterados incluidos en los triglicéridos, como se observa en la Figura 13, donde se indican algunas de las moléculas presentes en la fracción polar y la reducción de la complejidad de la fracción cuando se obtienen derivados más simples. Puesto que no es posible distinguir entre moléculas con 3,2,1 ó ningún resto acilo modificado, el porcentaje de ácidos alterados podría ser variable para una alteración total expresada en compuestos glicerídicos.

Por otra parte, la separación por exclusión de los compuestos glicerídicos no permite obtener una conclusión sobre la distribución de pesos moleculares de los ácidos grasos. Así, en la Figura 14, se indican dos posibles estructuras para un trímero de triglicérido, a partir de las cuales se obtendría una composición muy distinta de los ácidos grasos constituyentes.

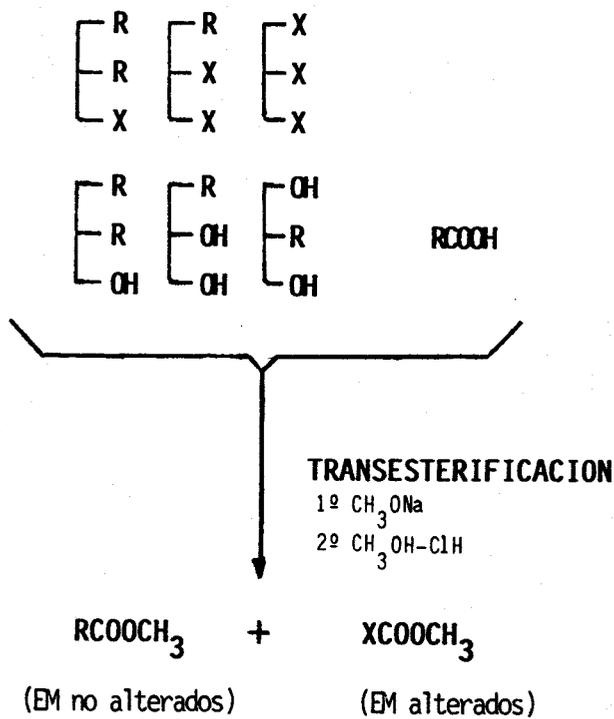


Figura 13.- Simplificación de estructuras de los compuestos polares glicerídicos como consecuencia de la formación de ésteres metílicos

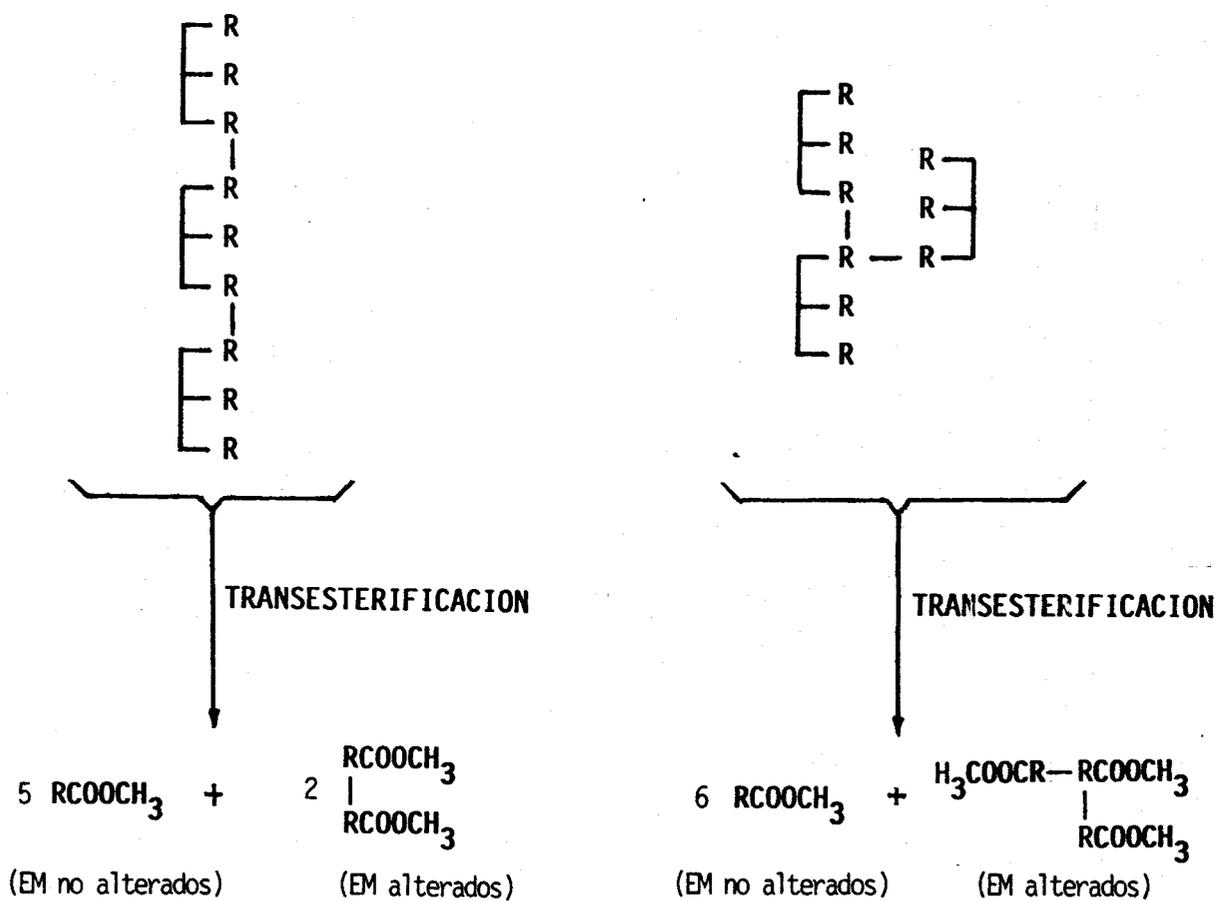


Figura 14.- Estructuras posibles para un trímero de triglicérido presente en la fracción polar de grasas termoxidadas.

Desde un punto de vista nutricional, ha sido ya definido que las modificaciones en las propiedades de la grasa se deben exclusivamente a las alteraciones relacionadas con los dobles enlaces que originan cambios en los restos acilo constituyentes de los triglicéridos, aumentando su polaridad. Se deduce, por tanto, que el conocimiento de la composición de la grasa en ácidos grasos modificados, tiene un significado mucho más claro en relación con su posible incidencia nutricional y que la definición de las grasas utilizadas en los estudios fisiológicos debería incluir lo más detalladamente posible la distribución de ácidos grasos de posible acción fisiológica.

En este apartado se estudian distintas posibilidades de aplicación de un procedimiento similar al descrito, pero partiendo de la muestra de ésteres metílicos obtenida tras la transesterificación de la grasa.

2.1.2.1.- MUESTRAS UTILIZADAS

Para el desarrollo y puesta a punto de la metodología analítica aplicada a los ésteres metílicos se han utilizado las siguientes muestras:

a) Compuestos de pureza cromatográfica superior al 99%

1.- Esteres metílicos de ácidos grasos no alterados:

- * Palmitato de metilo
- * Estearato de metilo
- * Oleato de metilo
- * Dos muestras de ésteres metílicos obtenidos a partir de aceites y grasas comestibles de distinto grado de insaturación.

2.- Esteres metílicos de ácidos dímeros no polares obtenidos a partir de ácido linoleico en condiciones de alteración térmica (220°C y presencia de nitrógeno). La posterior purificación se realiza mediante cromatografía en capa fina, tras su aislamiento previo mediante cromatografía en columna de sílice (101).

b) Muestras de aceite de oliva y girasol utilizadas en los ensayos nutricionales, cuyas características han sido descritas en las Tablas IV y V.

2.1.2.2.- ENSAYOS PREVIOS

La existencia de un método analítico, desarrollado en nuestro laboratorio, para la determinación cuantitativa global de los ácidos grasos no alterados y polares (85), ha simplificado la realización de los ensayos previos. En el estudio se establecen las mejores condiciones de derivatización y las modificaciones necesarias para obtener una separación de los ésteres metílicos con similar eficacia y reproducibilidad que la determinación de compuestos glicerídicos polares.

En resumen, tras la obtención de los ésteres metílicos mediante transesterificación con CH_3ONa , la muestra se separa en idénticas condiciones a las propuestas por la I.U.P.A.C. para la grasa, con la única excepción del disolvente utilizado para la elución de la fracción no alterada que es, en este caso, una mezcla de hexano - éter etílico en relación 96:4.

La Figura 15 resume los primeros resultados obtenidos utilizando las condiciones detalladas en el esquema.

La separación cromatográfica mediante cromatografía de exclusión se ha realizado en las mismas condiciones establecidas para los triglicéridos. El análisis de la eficacia de la separación en iguales circunstancias resultaba prioritario, por las ventajas que supone el establecer en el equipo cromatográfico unas condiciones estandar para determinar indistintamente los compuestos de interés, como triglicéridos o como ésteres metílicos. Afortunadamente, como puede observarse, se obtuvieron buenas separaciones que permiten cuantificar independientemente 4 grupos de compuestos: ácidos monómeros no alterados y oxidados, dímeros y polímeros.

No obstante, aún ha sido posible efectuar una modificación que consideramos de interés. A excepción de los ácidos monómeros los otros dos grupos incluyen dímeros y polímeros originados tanto por

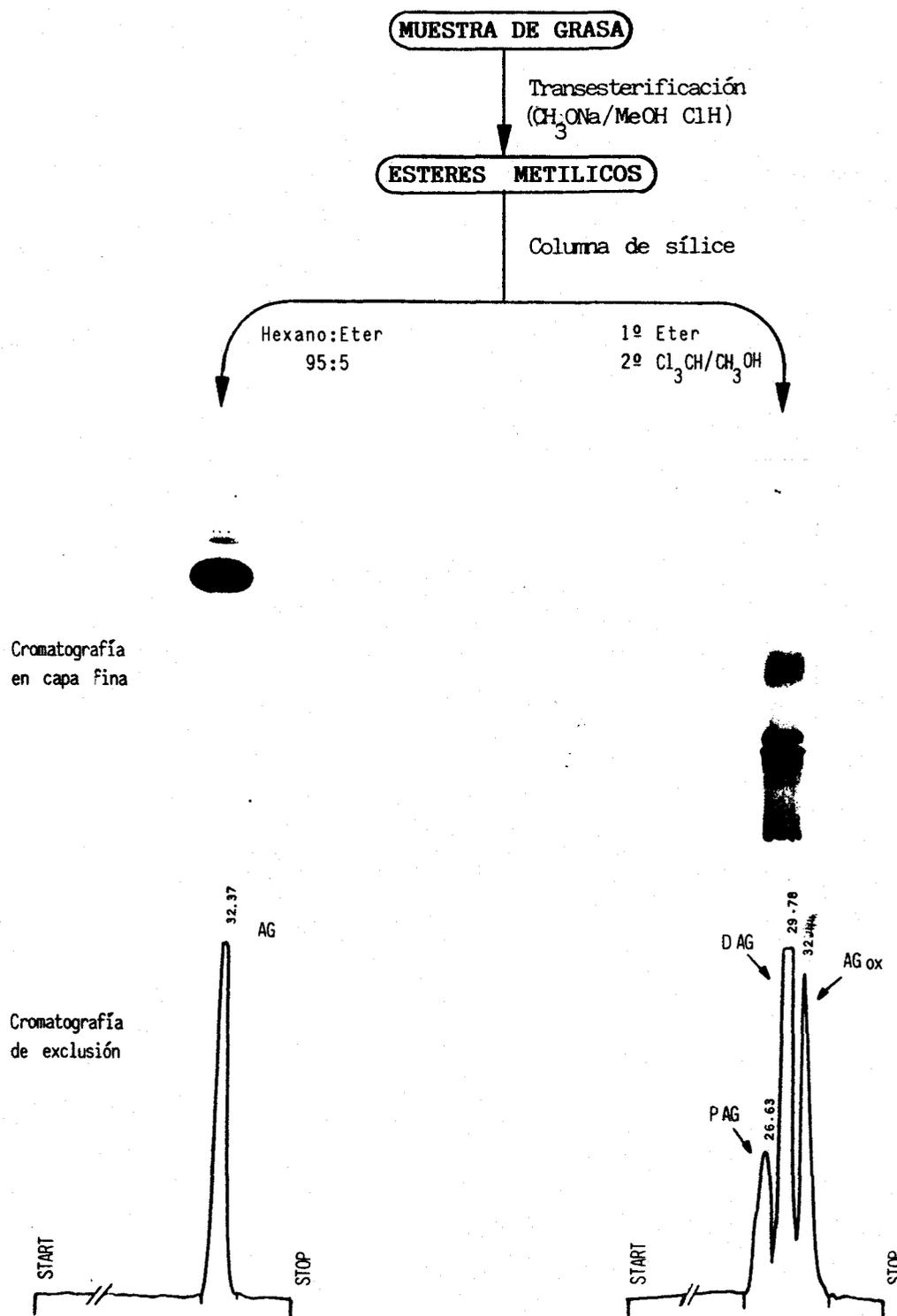


Figura 15.- Esquema general para la separación de ésteres metílicos de ácidos presentes en grasas termoxidadas.

vía oxidativa como térmica. La modificación realizada sobre este esquema inicial ha consistido en separar los ácidos grasos dímeros en dos grupos, aprovechando su diferente polaridad.

Como se observa en la Figura 15, la banda de menor polaridad dentro de los ácidos alterados corresponde a los dímeros térmicos, cuya concentración en la muestra sólo es apreciable cuando ha sido sometida a temperaturas elevadas. Dada su baja polaridad y el interés que tiene la diferenciación de los dos tipos de dímeros, se han cambiado las condiciones de elución de la primera fracción para obtener conjuntamente en esta primera fracción los dímeros de baja polaridad y los ácidos no alterados. El eluyente más idóneo para conseguir esta separación es la mezcla hexano:éter etílico en una relación 88:12, que conduce a una indudable mejora ya que permite cuantificar perfectamente ambos tipos de dímeros por separado.

La Figura 16 resume el esquema aplicado con esta nueva modificación, que muestra, en relación con el esquema anterior, el desdoblamiento del pico correspondiente a los ácidos dímeros. La primera fracción separada contiene ahora la totalidad de los ácidos grasos no alterados y de los ácidos grasos dímeros no polares, mientras que permanecen sin eluir los ácidos monómeros oxidados, dímeros oxidados y polímeros.

En relación con los factores de respuesta, en la Figura 17 se encuentran las rectas de calibrado obtenidas para los ésteres metílicos de ácidos grasos y ésteres metílicos de ácidos dímeros de baja polaridad. En el caso de los ésteres metílicos se han utilizado 3 soluciones de cada una de las 5 muestras que se detallan en el epígrafe 2.1.2.1. Las ecuaciones de las rectas, coeficientes de correlación y número de determinaciones se detallan en la figura. Dada la mayor respuesta encontrada para los ácidos dímeros, los compuestos de la fracción de menor polaridad han sido cuantificados a partir de las rectas de calibrado, mientras que la cuantificación de la fracción más

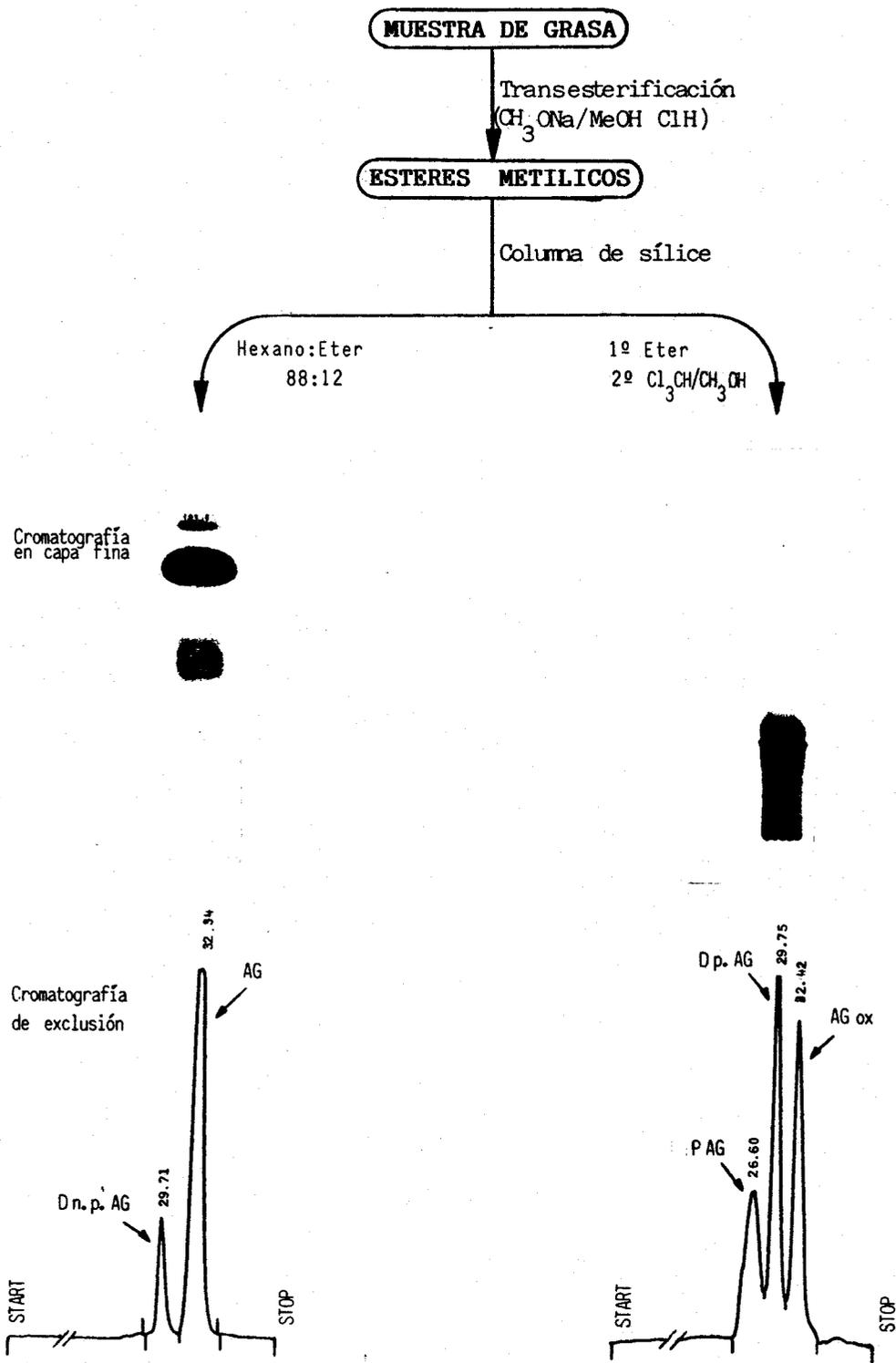
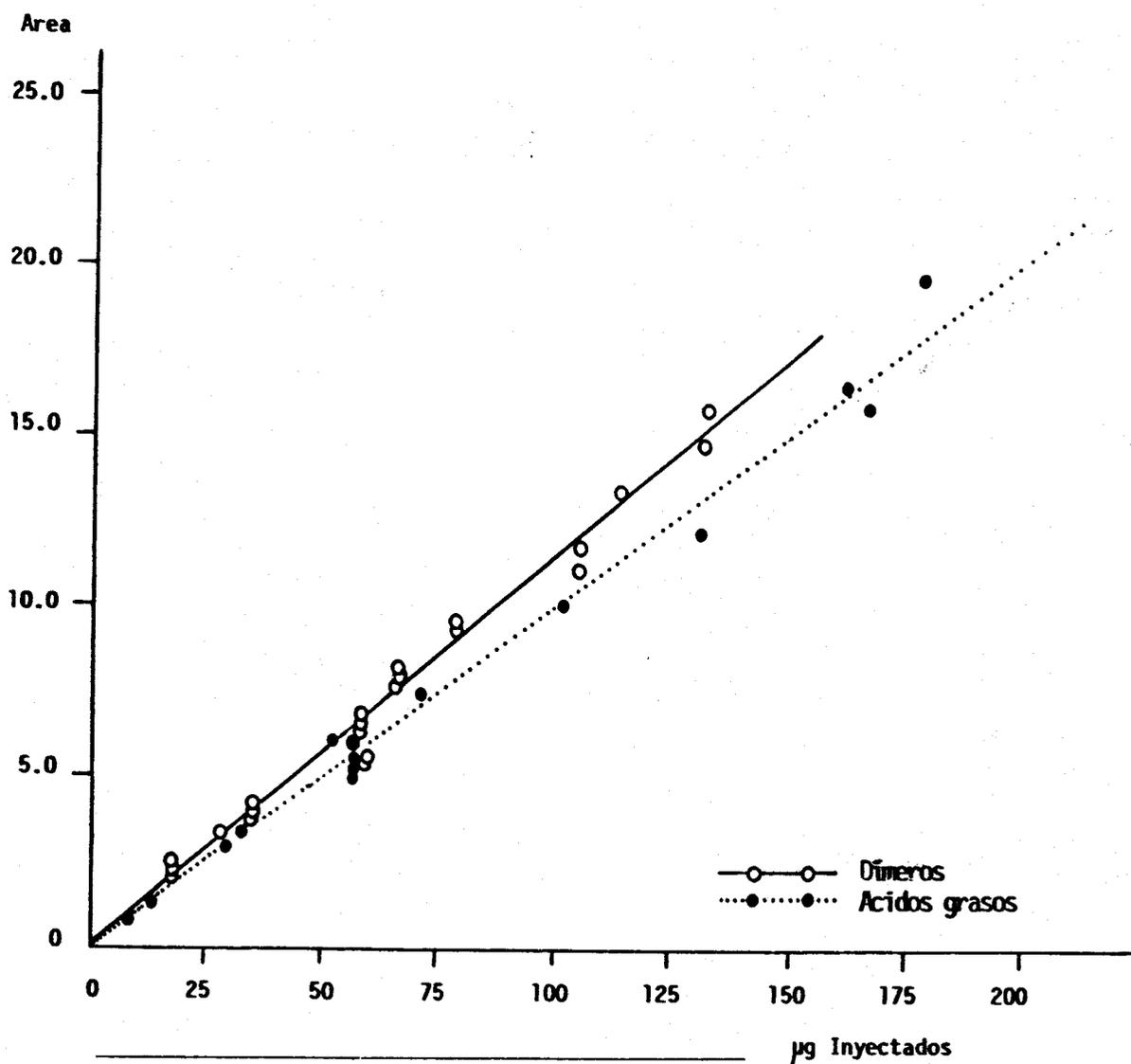


Figura 16.- Esquema general modificado para la separación de ésteres metílicos de ácidos presentes en grasas termoxidadas.



	Ecuación de la recta	r	n
Dimeros	$y = - 0.121 + 0.115 x$	0.9905	24
Acidos Grasos	$y = - 0.252 + 0.104 x$	0.9889	15

Figura 17.- Rectas de calibrado para ésteres metílicos de ácidos grasos no alterados y de dímeros no polares.

polar, de composición más heterogénea, se ha realizado asignando iguales factores de respuesta para los tres grupos de compuestos incluidos en la misma, ya que es imposible disponer de rectas de calibrado.

En definitiva, este último esquema, que ha sido seleccionado en todos los estudios posteriores, permite separar los ácidos grasos en cinco grupos específicos: ácidos no alterados, ácidos monómeros oxidados, ácidos dímeros no polares, ácidos dímeros oxidados y ácidos polímeros.

2.1.2.3.- PROCEDIMIENTO ANALITICO

a) Preparación de los ésteres metílicos

Se ha utilizado básicamente la NORMA UNE 55-037-73, con ligeras modificaciones, que se recogen a continuación:

Se pesa 1 g de grasa en un matraz de 100 ml al que se le añaden 25 ml de disolución de metilato sódico 0,2 N en metanol. Después de hervir a reflujo durante 5 minutos hasta obtención de una sola fase, se interrumpe la calefacción y se agregan al matraz unas gotas de fenolftaleína y disolución de ClH al 2% en metanol hasta viraje del indicador, manteniendo la muestra en ebullición otros 5 minutos. A continuación, se agrega disolución acuosa saturada en ClNa en cantidad suficiente para que al añadirle 3 ó 4 ml de hexano, éste quede en el cuello del matraz. Se extrae repetidas veces con hexano para garantizar una buena extracción de los ésteres metílicos, evaporándose el disolvente en un rotavapor bajo corriente de nitrógeno.

b) Separación de los ésteres metílicos polares mediante cromatografía en columna de sílice

1 g de ésteres metílicos, pesados con exactitud del mg, se disuelven en 20 ml de hexano:éter etílico 96:4 y se transfieren a la columna cromatográfica siguiéndose exactamente la metódica recomendada por la I.U.P.A.C. y detallada en el epígrafe 2.1.1.3., excepto en lo que se refiere a la relación hexano:éter etílico utilizada en el relleno de la columna y la elución de la primera fracción que es, en este caso 88:12.

La eficacia de la separación se comprueba mediante cromatografía en capa fina para lo cual las fracciones no polar y polar obtenidas se diluyen al 10% en Cl₃CH. Se aplican 10 µl en una placa

de silicagel de 0,25 mm de espesor y se eluye con hexano:éter etílico:acético 80:20:1. La visualización de las manchas se realiza con vapores de yodo o pulverizando con SO_4H_2 al 50% y posterior carbonización.

c) Determinación cuantitativa mediante cromatografía de exclusión

Cantidades de ambas fracciones comprendidas entre 50 y 75 mg se pesan, con exactitud del mg, en matraces aforados de 5 ml, que se enrasan posteriormente con tetrahidrofurano. Las muestras se analizan en un cromatógrafo KONIK 500A utilizando las siguientes condiciones:

- * Columnas de Ultrastyrigel de 100 y 500 Å conectadas en serie, de 30 cm de longitud y 7,5 mm de d.i.
- * Muestra inyectada: 10 μl
- * Fase móvil: Tetrahidrofurano
- * Flujo: 0,5 ml/min
- * Detector de Índice de Refracción (HP-1037A)

— RESULTADOS Y DISCUSION —

La Tabla VI resume los valores medios y sus límites de confianza, obtenidos a partir de las cuatro determinaciones realizadas en cada una de las muestras de grasa utilizadas en los ensayos nutricionales. La reproducibilidad es elevada y del mismo orden que la encontrada para los compuestos glicéricos. Sin embargo, en este caso no ha sido cuantificada la fracción polar de las muestras no calentadas

	OLIVA REFINADO				GIRASOL REFINADO				OLIVA PURO					
	No calentado		Termoxidado 100 horas		No calentado		Termoxidado 100 horas		(1) No calentado		Mezcla al 50% de (1) y (2)		(2) Termoxidado 150 horas	
	\bar{x}^*	$tS_{\bar{x}}^*$	\bar{x}	$tS_{\bar{x}}$	\bar{x}	$tS_{\bar{x}}$	\bar{x}	$tS_{\bar{x}}$	\bar{x}	$tS_{\bar{x}}$	\bar{x}	$tS_{\bar{x}}$	\bar{x}	$tS_{\bar{x}}$
ACIDOS GRASOS NO ALTERADOS	98,7	0,51	62,8	0,35	97,5	0,25	55,2	0,44	98,3	0,51	81,5	1,24	65,3	0,92
ACIDOS POLARES :	1,3	0,51	36,7	0,76	2,5	0,25	43,9	0,80	1,7	0,51	18,2	0,86	34,1	1,11
- Polímeros	-	-	9,71	0,28	-	-	14,37	0,64	-	-	7,41	0,51	13,82	1,94
- Dímeros térmicos	-	-	3,82	0,19	-	-	9,31	0,73	-	-	1,87	0,19	3,67	0,35
- Dímeros oxidados	-	-	10,29	0,54	-	-	15,50	0,44	-	-	4,30	0,44	8,20	0,64
- Monómeros oxidados	-	-	12,78	1,24	-	-	4,62	0,73	-	-	4,62	0,52	8,68	0,29

* Media de 4 determinaciones en cada caso (t= 3,182)

Tabla VI.- Determinación cuantitativa de ácidos monómeros, dímeros y polímeros en los aceites de oliva y girasol.

ya que, dada su pequeña proporción en la muestra total, los resultados cuantitativos obtenidos carecen de exactitud por la elevada participación de los compuestos del insaponificable que eluyen conjuntamente con los monómeros oxidados. La muestra preparada a partir de iguales cantidades de los aceites de oliva no calentado y termoxidado 150 horas muestra, nuevamente, la similitud de los resultados obtenidos con los que se obtendrían a partir de una mezcla teórica.

En relación con las muestras termoxidadas que han sido cuantificadas, es de destacar que, para una alteración total del mismo orden, la comparación de los resultados obtenidos para los aceites de oliva calentados 100 y 150 horas respectivamente, muestra claramente el progreso de la reacción de polimerización con el tiempo. Así, el primero de los aceites está mucho más concentrado en los productos de oxidación monoméricos y diméricos, mientras la fracción más abundante en el segundo son los compuestos de peso molecular más elevado. Igualmente, en similares condiciones de tratamiento - 100 horas - es notoria la mayor polimerización obtenida en el aceite de girasol, muy relacionada con su elevado grado de insaturación.

Al margen del interés que tiene la determinación para conocer el efecto de un determinado tratamiento termoxidativo sobre la grasa y para establecer comparaciones directas entre muestras de grasa, es importante destacar la relación existente entre los resultados obtenidos para los compuestos glicerídicos y los ésteres metílicos, lo que demuestra la complementariedad de ambas determinaciones para obtener una información más completa sobre el estado de la grasa.

A partir de los datos que se encuentran en las Tablas V y VI se pueden establecer las siguientes deducciones:

- 1º) Como era lógico esperar, los valores obtenidos para los ácidos grasos no alterados son muy superiores a los triglicéridos no alterados; la diferencia entre ambos representa la cantidad de

ácidos no alterados incluidos en glicéridos polares, y constituye aproximadamente un 50% en el caso de las muestras termoxidadas.

- 2º) Por otra parte, dado que el paso de triglicérido a ester metílico tiene lugar sin modificación significativa del peso de la grasa (85), la relación entre la cantidades de ácidos alterados y de compuestos glicerídicos polares permite conocer la media de restos acilo degradados por cada molécula de triglicérido, que oscila desde 0,76 en el aceite de oliva refinado, hasta 1,71 en el aceite de girasol termoxidado.
- 3º) Resulta especialmente significativa la elevada cantidad de ácidos dímeros y polímeros en las muestras termoxidadas, lo que indicaría la existencia de moléculas poliméricas de triglicérido de estructura muy compleja.

Finalmente, es de resaltar, en relación con este apartado, que una evaluación cuantitativa tan detallada de los principales grupos de ácidos grasos alterados no ha sido realizada previamente y, por tanto, el procedimiento propuesto es de indudable valor para la definición de las muestras de grasa termoxidada utilizadas en los estudios nutricionales y toxicológicos. Ello permitiría disponer de una base mucho más segura que la enumeración, siempre deficiente, de las condiciones de tratamiento, para establecer la significación de los resultados obtenidos en distintas experiencias.

En este estudio, se analiza en apartados posteriores su aplicación a la determinación de los compuestos de alteración no absorbidos que proporcionan, indirectamente, datos valiosos sobre las posibilidades de absorción de los distintos grupos de compuestos.

**2.2.- EVALUACION DE LAS TASAS DE ABSORCION DE LOS
COMPUESTOS ORIGINADOS EN LA TERMOXIDACION DE
GRASAS**

Una vez establecido el procedimiento analítico que permite cuantificar los principales grupos de compuestos originados en la alteración de las grasas, su aplicación a las muestras de lípidos presentes en las heces de animales experimentales que han ingerido grasas termoxidadas permitiría conocer las cantidades de los diferentes grupos que no han sido capaces de atravesar la membrana intestinal.

Teniendo en cuenta las escasas conclusiones que se derivan de los estudios toxicológicos y nutricionales previos, esta evaluación es de gran interés debido, principalmente, a las siguientes razones:

- 1) A partir del conocimiento de los compuestos no absorbidos sería posible determinar a priori la cantidad de compuestos de alteración que serían asimilados tras la ingestión de una determinada grasa termoxidada.
- 2) El análisis comparativo de las tasas de absorción de los diferentes grupos permitiría establecer condiciones más reales en estudios

realizados con animales experimentales, cuando las grasas son suministradas por vía distinta a la oral.

No obstante, no debe olvidarse que la sistemática desarrollada ha sido aplicada a grasas comestibles termoxidadas con unas características bien definidas y, por ello, es necesario no sólo establecer sus posibilidades de aplicación a los lípidos no absorbidos, de muy diferente composición, sino también decidir el procedimiento más adecuado para la realización de las etapas previas a la obtención de la grasa a partir de las heces.

En este capítulo, se detalla la metodología utilizada en este estudio y se recogen los resultados de dos experiencias realizadas con ratas de la cepa Wistar: la primera de ellas con el objetivo fundamental de definir las mejores condiciones de los ensayos y de la evaluación analítica de los lípidos no absorbidos, y, la segunda, para establecer de forma rigurosa las tasas de absorción de los diferentes grupos de compuestos.

2.2.1.- Metodología general

2.2.1.1.- CARACTERISTICAS GENERALES DE LAS EXPERIENCIAS REALIZADAS CON ANIMALES

Se han realizado 3 experiencias con animales de experimentación, cuyas características específicas y objetivos son detallados con posterioridad, en los apartados 2.2.2., 2.2.3. y 2.3.3.

Todas las experiencias se han llevado a cabo con ratas macho de la cepa Wistar, con un peso inicial aproximado de 100 g, distribuidas en lotes homogéneos de 4 animales cada uno, incluyendo grupos adicionales control.

Se utilizaron 2 dietas, ambas adecuadas para la especie y fase de crecimiento, cuyas composiciones se recogen a continuación:

A. DIETA DE MANTENIMIENTO

- Humedad	12,0%
- Proteínas	17,0%
- Lípidos	3,0%
- Extracto libre de nitrógeno	58,7%
- Celulosa	4,3%
- Minerales	5,0%

B. DIETA ALIPIDICA PURIFICADA

- Humedad	10,0%
- Proteínas	19,8%
- Extracto libre de nitrógeno	57,6%
- Celulosa	5,4%
- Minerales	6,2%
- Complejo vitamínico	1,0%

Las grasas fueron incorporadas a niveles de concentración comprendidos entre el 6 y el 20%, incluyendo además distintos grados de alteración. Las grasas utilizadas son aceites de girasol y oliva, tanto frescos como sometidos previamente a condiciones termoxidas.

Las dietas se prepararon semanalmente y, para evitar su deterioro, se envasaron en frascos herméticamente cerrados con nitrógeno, que se conservaron a 4°C hasta el momento de su administración a los animales.

Durante el periodo experimental los animales se mantuvieron a $21 \pm 2^\circ\text{C}$ de temperatura ambiente y en células metabólicas individuales que permiten cuantificar la ingesta y las excreciones fecal y urinaria.

Se estableció un periodo previo de acondicionamiento durante el cual no se recogieron las heces ni se controló el consumo de alimento. Este periodo previo tiene por objeto permitir que los animales se acostumbren a las nuevas condiciones: jaulas, dietas, aislamiento, etc.

En el periodo principal los animales ingirieron "ad libitum" agua y su dieta correspondiente y se realizaba un control riguroso de la ingesta sólida y líquida diariamente. Los animales se pesaban y se examinaban posibles anormalidades semanalmente. Las heces fueron recogidas y pesadas diariamente y mantenidas en congelador hasta el momento de su extracción.

2.2.1.2.- METODOS ANALITICOS

a) Esquema general aplicado a aceites de las dietas

La evaluación de los aceites de las dietas han sido ya realizadas en el apartado 2.1. de este estudio e incluye tanto la cuantificación de los compuestos de alteración glicerídicos como de los distintos grupos de ácidos grasos alterados.

Todos los detalles de la metodología seguida se encuentran descritos en los epígrafes 2.1.1. y 2.1.2. y los resultados obtenidos se recogen en las Tablas V y VI. Igualmente, en la Tabla IV se encuentran los principales índices utilizados para la evaluación de la calidad de los mismos así como su composición en ácidos grasos.

b) Esquema general aplicado a heces de animales experimentales

El esquema general aplicado a los lípidos no absorbidos presentes en las heces de los animales experimentales se muestra en la Figura 18 e incluye una serie de etapas previas al análisis de la grasa, que se detallan a continuación:

1.- DESECACION

Las heces obtenidas durante el periodo de control en jaulas de metabolismo se colocan en cápsulas de fondo plano, previamente taradas, y se desecan en estufa de vacío a 50°C hasta peso constante.

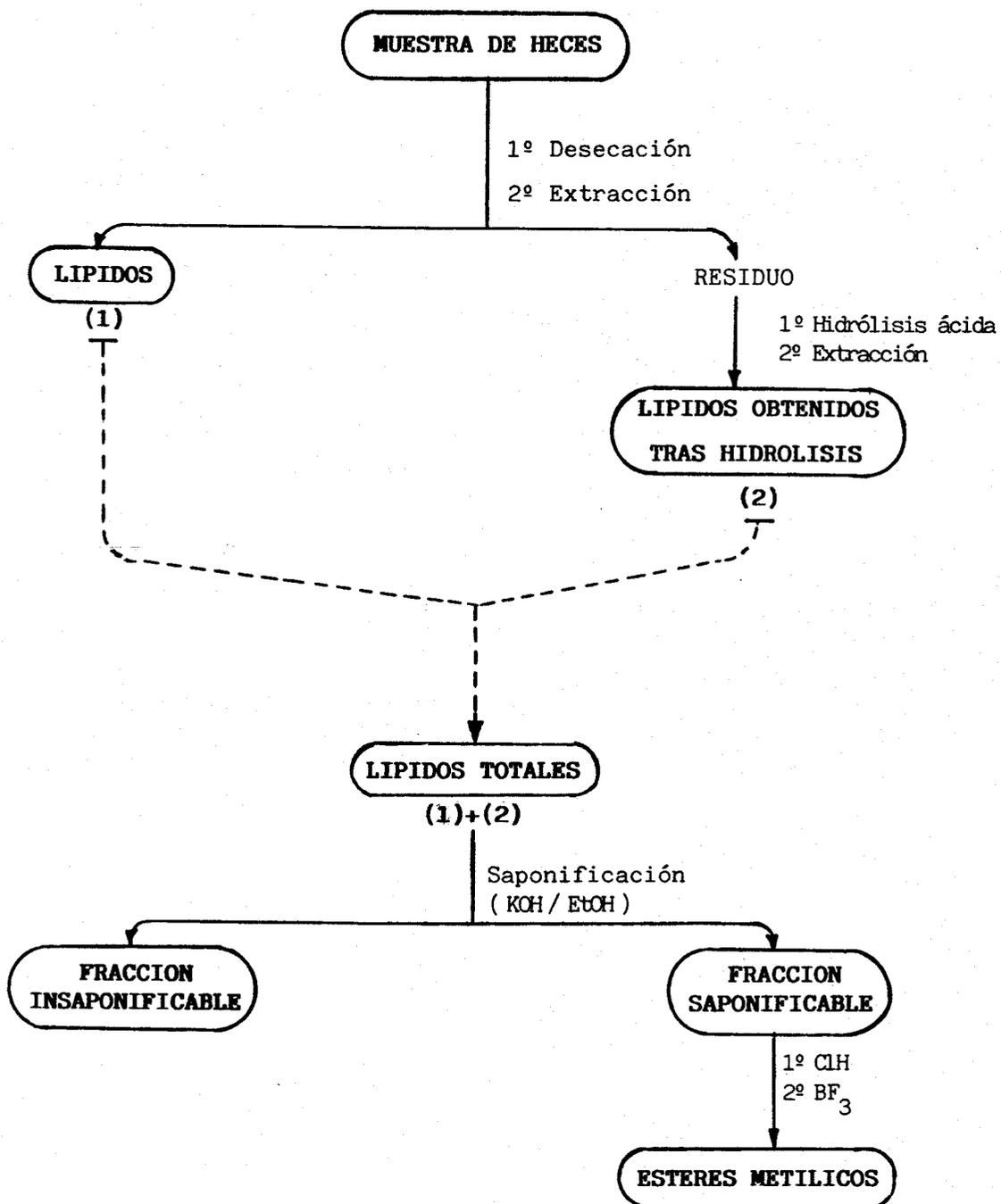


Figura 18.- Esquema analítico general aplicado a los lípidos no absorbidos.

2.- EXTRACCION DE LOS LIPIDOS NO ABSORBIDOS

La obtención de los lípidos se realiza en 2 etapas, para garantizar su total extracción (186).

- Obtención directa de lípidos

Las heces desecadas se pulverizan y el polvo se introduce en cartuchos de papel de filtro - unos 20 g de muestra por cada cartucho - recubierto de un tapón de algodón desengrasado. Los cartuchos se pasan a extractores Söxhlet, utilizando éter etílico como disolvente, y se mantienen en funcionamiento durante 7 horas, tiempo suficiente para garantizar la extracción total de la grasa. El extracto etéreo se somete a evaporación en un rotavapor bajo corriente de nitrógeno para eliminar el disolvente, hasta peso constante.

- Obtención de lípidos previa hidrólisis ácida

Una vez desecadas las heces ya extraídas, se someten a hidrólisis en frío con 400 ml de ClH 3 N. Posteriormente, se añade una cantidad de material de filtración suficiente para evitar la pérdida de lípidos. Se filtra sobre un papel de filtro mojado, exento de materia grasa, y se lava el residuo con agua destilada hasta la desaparición de reacción ácida. Tras verificar que el filtrado no contiene materia grasa, se seca el doble papel de filtro conteniendo el residuo en estufa de vacío a 50°C hasta peso constante. Se introduce el doble filtro y el residuo seco en un cartucho de extracción y se extrae nuevamente con éter etílico por el procedimiento Söxhlet, durante 7 horas. El extracto etéreo se somete a evaporación con rotavapor bajo corriente de nitrógeno para eliminar el disolvente hasta peso constante.

Una vez extraídas y pesadas ambas fracciones de los lípidos presentes en heces, se toman cantidades proporcionales de las mismas para constituir la muestra representativa de los lípidos totales no absorbidos.

3.- DETERMINACION DE LA FRACCION INSAPONIFICABLE

Se ha seguido la NORMA UNE 55-004-73, que se resume a continuación:

Se pesa, con exactitud del mg, 1 g de grasa, se añaden 50 ml de solución alcohólica de KOH 1N y se saponifica durante 1 hora a reflujo, agitando de vez en cuando. La solución se trasvasa a un embudo de decantación con 100 ml de agua destilada, se deja enfriar y se añaden 100 ml de éter etílico, se agita y se espera hasta clara separación de las capas. La capa acuosa vuelve al matraz de saponificación y la etérea pasa a otro embudo de decantación conteniendo 40 ml de agua destilada. La solución jabonosa, que está en el matraz de saponificación, se pasa de nuevo al primer embudo y se vuelve a extraer dos veces más con porciones de 100 ml de éter etílico. Las porciones etéreas se reúnen en el segundo embudo de decantación y, sin sacudidas violentas, se agitan con el agua que había en él, y posteriormente se lavan alternativamente con 40 ml de solución acuosa de KOH 0,5N y con 40 ml de agua destilada, repitiendo dos veces la operación y prolongando el lavado con agua hasta que sea neutra a la fenolftaleína. Las aguas de lavado se añaden a la solución jabonosa para la determinación posterior de los ácidos grasos totales. La solución etérea se trasvasa a un matraz tarado, se añaden 6 ml de acetona y se elimina completamente el disolvente volátil en evaporador rotatorio al vacío. Se termina el secado por medio de corriente de nitrógeno, hasta peso constante.

4.- DETERMINACION DE ACIDOS GRASOS TOTALES

Las soluciones alcohólicas de jabones y las aguas de lavado, que quedan después de la separación de los insaponificables, se reúnen en un embudo de decantación y se añade ClH 1N, agitando constantemente y hasta acidificación, lo que se nota por la desaparición de la espuma y se comprueba con papel indicador de pH. Se deja enfriar,

se extrae varias veces con porciones de 100 ml de éter etílico y se lavan las porciones etéreas reunidas con solución acuosa de ClNa al 10%. Por último, se añade SO_4Na anhidro, se filtra sobre un matraz tarado, se evapora el éter en rotavapor a vacío y se eliminan los restos de disolvente por medio de corriente de nitrógeno, hasta peso constante.

5.- OBTENCION DE LOS ESTERES METILICOS (187)

Se pesan 300-350 mg de la muestra de ácidos grasos, en un matraz de 50 ml al que se añaden 4 ml de reactivo BF_3 2M en metanol. Después de hervir durante 3 minutos, se interrumpe la calefacción y se agrega al matraz disolución acuosa saturada en ClNa, en cantidad suficiente para que al añadirle 3 ó 4 ml de hexano, éste quede en el cuello del matraz. Se extrae repetidas veces con hexano para garantizar una buena extracción de los ésteres metílicos, evaporándose el disolvente en un rotavapor bajo corriente de nitrógeno.

6.- SEPARACION DE LOS ESTERES METILICOS MEDIANTE CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DE SILICE

Se sigue la metódica detallada en el epígrafe 2.1.2.3.b. con las siguientes modificaciones:

- La columna de vidrio utilizada posee 40 cm de altura y 0,9 cm de d.i.
- Para la preparación de la columna cromatográfica se pesan 6 g de sílice y se añaden 20 ml de hexano-éter etílico 88:12.
- Se pesan 300 mg de ésteres metílicos, con exactitud del mg, se disuelven en 5-8 ml de hexano-éter etílico 88:12 y, a continuación se transfiere a la columna cromatográfica.

- La fracción no polar se eluye con 50 ml de hexano-éter etílico 88:12 y la elución de la fracción polar se realiza con 50 ml de éter etílico y 50 ml de cloroformo-metanol 2:1.

7.- DETERMINACION CUANTITATIVA DE LOS ACIDOS GRASOS MEDIANTE CROMATOGRAFIA DE EXCLUSION

La evaluación cuantitativa de los grupos de ácidos grasos se lleva a cabo siguiendo el procedimiento descrito en el epígrafe 2.1.2.3.c.

c) **Otras determinaciones de interés**

1.- DETERMINACION DE ACIDOS GRASOS POR CROMATOGRAFIA GAS-LIQUIDO

... Preparación de la muestra

Determinación porcentual:

Se obtienen los ésteres metílicos a partir de 100 mg de lípidos siguiendo la NORMA UNE 55-037-73, se pesan los ésteres metílicos extraídos, con exactitud del mg, en un matraz aforado de 5 ml, y se enrasa a continuación con hexano. 1 μ l de esta disolución se inyecta directamente en el cromatógrafo de gases, en las condiciones que serán descritas con posterioridad, lo que permite obtener los porcentajes de cada ácido respecto al total de los mismos en la muestra.

Cuantificación con patrón interno:

Se procede de igual forma a la anteriormente descrita, pero añadiendo a la muestra inicial de lípidos 1 ml de una disolución que contiene 8 mg/ml de ácido heptadecanoico, utilizado como patrón interno.

La cantidad de cada ácido en la muestra problema se obtiene fácilmente teniendo en cuenta la respuesta obtenida para el C_{17:0} :

$$\frac{\text{CANTIDAD DE ACIDO}}{\mathbf{A}} = \frac{\text{AREA OBTENIDA}}{\text{PARA } \mathbf{A}} \times \frac{\text{CANTIDAD C}_{17:0}}{\text{AREA C}_{17:0}}$$

...Análisis cromatográfico

Se ha utilizado un cromatógrafo HP-5880 A, equipado con detector de ionización de llama. Las condiciones cromatográficas han sido las siguientes:

- * Columna GP 3% SP-2310 / 2% SP-2300 sobre Chromosorb 100/120 mallas
- * Muestra inyectada: 1 µl
- * Flujo de nitrógeno: 20 ml/min
- * Temperatura del horno: programada desde 180°C a 220°C a 2°C/min y 20 min de isoterma inicial
- * Temperatura del detector: 250°C
- * Temperatura del inyector: 250°C

2.- DETERMINACION DE LA ACIDEZ LIBRE

Se sigue la NORMA UNE 55-011, que se resume a continuación:

Se prepara una mezcla, en partes iguales, de alcohol etílico de 96° y éter etílico, adicionándole disolución alcohólica de fenolftaleína al 1% como indicador. La mezcla se neutraliza con disolución de KOH 0,1N valorada previamente utilizando como patrón ácido benzoico purificado, en el laboratorio, por sublimación.

Se pesan 100 mg de grasa, con exactitud del mg. El disolvente neutralizado, preparado según se indica anteriormente, se vierte en el matraz y se agita, hasta conseguir la disolución completa de la grasa. Seguidamente se valora con disolución de KOH 0,1N. La adición de KOH se hace agitando constantemente, dándose por terminada la valoración cuando la adición de una sola gota produce un viraje débil, pero definido, que persiste durante unos segundos.

El grado de acidez se expresa en porcentaje de ácido oleico y se calcula de la siguiente forma:

$$\text{ACIDO OLEICO, \%} = \frac{28,2 \times V \times N}{G}$$

G: Peso de lípidos, en gramos

V: Volumen consumido de la disolución de KOH, en ml

N: Normalidad de la disolución alcalina utilizada

2.2.2.- Experiencia inicial: puesta a punto de las técnicas analíticas y selección de variables en los ensayos nutricionales

El objetivo primordial de esta experiencia ha sido definir las mejores condiciones de realización de los ensayos con animales de experimentación y estudiar la aplicación de los procedimientos analíticos desarrollados a muestras de lípidos no absorbidos de muy diferente naturaleza. Las conclusiones obtenidas permitirán establecer, en su caso, las modificaciones necesarias para cuantificar posteriormente con exactitud los compuestos no absorbidos presentes en las heces de los animales.

Con este fin, se han establecido en esta primera experiencia los siguientes objetivos concretos:

- 1º) Garantizar la reproducibilidad de las técnicas previas a la obtención de los lípidos presentes en heces.
- 2º) Solucionar los problemas que pueden plantearse en la aplicación del método analítico a lípidos de composición desconocida.
- 3º) Conocer las diferencias entre animales y establecer el número de grupos y de animales por grupo más adecuado.
- 4º) Decidir, en función de las cantidades de lípidos obtenidos, la duración óptima de los periodos de control del ensayo.

- 5º) Definir las mejores condiciones de composición de las dietas (aceites más idóneos, proporción y grado de alteración más adecuados).

Es fácilmente comprensible que, dado el desfase de tiempo entre el planteamiento de la experiencia y la obtención de resultados, cualquier conclusión que lleve a establecer un cambio en las condiciones del ensayo, obliga a la realización de una nueva experiencia que incluye las modificaciones de interés, como se establece en el apartado 2.2.3. No obstante, a partir de los resultados obtenidos en este ensayo, se han deducido otras conclusiones que van más allá de los objetivos establecidos y que indican ya el diferente comportamiento de los compuestos de alteración en la etapa de absorción.

2.2.2.1.- PLANTEAMIENTO DE LA EXPERIENCIA

Animales y tratamientos

4 grupos de ratas Wistar, constituidos por 4 animales cada uno, han sido alimentados con una dieta base suplementada con la adición de aceites refinados de oliva y girasol no calentados y calentados durante 100 horas a 190°C en condiciones termoxidativas. Al mismo tiempo se ha mantenido 1 grupo adicional de control, alimentado exclusivamente con la dieta base, cuya composición se recoge a continuación:

- HUMEDAD	12,0%
- PROTEINAS	17,0%
vegetales (turtó)	
animales (pescado)	
- LIPIDOS	3,0%
- E. L. N.	58,7%
(cereales, azúcar)	
- CELULOSA (Weende)	4,3%
- MINERALES	5,0%

La duración del ensayo ha sido de 7 meses en total, a lo largo de los cuales los mismos animales se sometieron a una dieta inicial conteniendo un 12% de grasa durante 3 meses, posteriormente 6% durante 2 meses y, finalmente, 18% los 2 últimos meses. Las cantidades de aceites adicionados han sido calculadas previamente para conseguir los niveles indicados, teniendo en cuenta la grasa inicialmente presente en la dieta base, cuyo análisis cuantitativo básico proporciona los siguientes resultados:

* <u>Insaponificable</u>	5,8%	
* <u>Acidos grasos no alterados</u>	87,3%	
* <u>Acidos grasos polares</u>	6,9%	
Composición Acidos grasos mayoritarios (g / 100 g de grasa)	C _{16:0}	14,3
	C _{16:1}	0,7
	C _{18:0}	2,2
	C _{18:1}	21,3
	C _{18:2}	48,8

Las determinaciones analíticas realizadas a los aceites que integran las dietas se recogen en las 4 primeras columnas de las Tablas V y VI.

Todos los animales, incluyendo el grupo control, han sido mantenidos en jaulas de metabolismo durante periodos de 5 días, con 2 días de adaptación previa. Así mismo, el grupo de control ha sido utilizado para la determinación de los lípidos de origen endógeno, siendo alimentado, en este caso, con la dieta previamente desengrasada.

Se llevó a cabo un control riguroso de las cantidades ingeridas y excretadas durante los 5 días que constituyen el periodo principal, en jaulas de metabolismo, a lo largo de los cuales los animales ingirieron "ad libitum" agua y su dieta correspondiente. Las heces fueron recogidas y pesadas diariamente, y mantenidas en congelador hasta que se completaba el periodo experimental para cada animal, tras el cual la grasa era extraída y mantenida a -27°C hasta el momento de su análisis.

2.2.2.2.- REPRODUCIBILIDAD DE LAS TECNICAS ANALITICAS PREVIAS AL ANALISIS DE LIPIDOS NO ABSORBIDOS

El estudio incluye el análisis de las etapas de desección de heces y extracción de los lípidos de las heces exentas de humedad.

a) Desección

Se ha ensayado el procedimiento de desección en estufa de vacío variando las condiciones de tiempo y temperatura. Considerando la conveniencia de no prolongar innecesariamente esta etapa y, al mismo tiempo, utilizar una temperatura moderada para evitar posibles alteraciones, se ha llevado a cabo la desección a vacío y a 50°C, hasta peso constante.

b) Extracción

Para la extracción mediante el procedimiento de Soxhlet se ensayaron distintos disolventes orgánicos - hexano, cloroformo, éter etílico - con características idóneas para la extracción de lípidos en un amplio rango de composición. Puesto que no se encontraron diferencias significativas en la cantidad obtenida, se seleccionó finalmente el éter etílico por tratarse del disolvente de más fácil eliminación. El tiempo necesario para garantizar la total extracción de los lípidos se estableció en 7 horas.

Dada la posibilidad de existencia de grasa no extraída en las condiciones indicadas, se ha procedido a una segunda extracción en Soxhlet, previa hidrólisis de las heces desengrasadas. Aunque es posible obtener la grasa en una única extracción de las heces previa hidrólisis ácida, se ha evitado este procedimiento para mantener la grasa parcialmente hidrolizada, en las mismas condiciones en que se encuentra en las heces.

La reproducibilidad de ambas etapas conjuntamente se ha obtenido a partir de 4 muestras de composiciones muy diferentes:

- 1.- Heces de animales alimentados con dieta que contiene 12% de grasa con bajo nivel de alteración (2,8% de la dieta base y 9,2% de aceite de girasol no calentado).
- 2.- Heces de animales alimentados con dieta que contiene 12% de grasa con alto nivel de alteración (2,8% de la dieta base y 9,2% de aceite de girasol calentado durante 100 horas a 190°C).
- 3.- Dieta conteniendo 12% de aceite de girasol no calentado, preparada a partir de la dieta base desengrasada.
- 4.- Dieta conteniendo 12% de aceite de girasol calentado durante 100 horas a 190°C, preparada a partir de la dieta base desengrasada.

Muestras de 30 g son desecadas por duplicado y, una vez exentas de humedad, extraídas, a su vez, por duplicado. Los procedimientos de desecación y extracción utilizados se detallan en el apartado 2.2.1.2. La reproducibilidad de las etapas se establece a partir de la cantidad de grasa obtenida y del porcentaje de ácidos grasos no alterados, evaluado con patrón interno y realizado por duplicado (8 datos por muestra).

— RESULTADOS Y DISCUSION —

Las Tablas VII y VIII recogen los resultados obtenidos para las 4 muestras, expresados en gramos de grasa por 100 gramos de muestra húmeda y gramos de ésteres metílicos no alterados por cada 100 gramos de lípidos, respectivamente. En ambos casos, puede observarse que los límites de confianza son inferiores al 5%, a pesar del elevado valor de t para 3 grados de libertad ($t = 2,365$).

Tabla VII.- Reproducibilidad de las etapas de desecación y extracción
(g/100 g muestra inicial)

	LIPIDOS HECES (Dieta girasol no calentado 12%)	LIPIDOS HECES (Dieta girasol termoxidado 12%)	DIETA 12% Girasol no calentado	DIETA 12% Girasol termoxidado
	1,97	5,32	11,82	11,93
	1,84	5,16	11,95	11,75
	1,91	4,97	12,17	11,88
	2,03	5,09	12,04	11,73
\bar{x}	1,94	5,13	11,99	11,84
$tS_{\bar{x}}$	0,13	0,22	0,15	0,19

Tabla VIII.- Reproducibilidad del porcentaje de ácidos grasos no alterados

	LIPIDOS HECES (Dieta girasol no calentado 12%)	LIPIDOS HECES (Dieta girasol termoxidado 12%)	DIETA 12% Girasol no calentado	DIETA 12% Girasol termoxidado
	50,92	29,58	97,32	57,41
	51,13	28,34	98,12	57,92
	51,84	29,12	97,62	56,83
	51,73	29,31	98,01	56,12
	52,64	28,83	97,31	56,34
	51,28	30,12	96,82	57,12
	50,41	29,11	97,34	55,88
	51,63	29,84	96,12	54,45
\bar{x}	51,45	29,28	97,33	56,51
$tS_{\bar{x}}$	0,57	0,47	0,54	0,90

Las muestras 3 y 4, que corresponden a la dieta a la que se ha añadido el aceite de composición conocida, son las de mayor interés para evaluar la exactitud de la determinación y la posibilidad de que existan modificaciones de la grasa durante las etapas analizadas. Como puede observarse, la cantidad de grasa obtenida en ambos casos tiene una desviación extremadamente pequeña con respecto a la cantidad adicionada (12 g de aceite / 88 g de dieta desengrasada), lo que indica claramente que la extracción de la grasa es completa.

Por otra parte, el porcentaje de ácidos grasos no alterados era de 97,5 y 55,2% para los aceites de girasol no calentado y termoxidado, respectivamente (Tabla VI), valores prácticamente idénticos a las medias obtenidas, aún utilizando un método analítico distinto. En la Tabla IX se muestran las composiciones en ácidos grasos mayoritarios, para el aceite de girasol no calentado y para las 8 muestras obtenidas tras la desecación y extracción de la dieta que lo contiene. Teniendo en cuenta que los errores de la determinación de los ácidos grasos pueden ser hasta del 5% para los ácidos que se encuentran en la muestra en proporción superior al 10% (188), puede concluirse que la alteración de la muestra no es significativa.

Tabla IX.- Aceite de girasol no calentado y muestras sometidas a etapas previas: composición en ácidos grasos mayoritarios.

ACIDOS GRASOS	ACEITE DE GIRASOL	DESECACION 1				DESECACION 2			
		EXTRACCION 1		EXTRACCION 2		EXTRACCION 1		EXTRACCION 2	
		1	2	3	4	5	6	7	8
C _{16:0}	8,2	8,8	9,1	8,3	8,1	9,1	8,0	9,0	9,1
C _{18:0}	5,0	5,4	4,9	4,7	4,6	5,5	4,7	5,1	4,9
C _{18:1}	27,8	27,5	26,8	27,3	26,7	29,2	28,9	26,7	28,1
C _{18:2}	59,0	58,3	59,2	59,7	60,6	56,2	58,4	59,2	57,9

2.2.2.3.- ANALISIS DE LOS LIPIDOS NO ABSORBIDOS

a) Características generales

Una vez comprobada la reproducibilidad de las etapas previas a la obtención de la grasa y la inexistencia de alteración, es importante conocer las características generales de los lípidos no absorbidos, para garantizar que el sistema analítico desarrollado para grasas comestibles es de aplicación al caso particular de estas muestras.

Muestras utilizadas y determinaciones analíticas

- a) Lípidos no absorbidos de origen endógeno, procedente de las heces de animales alimentados con dieta desengrasada.
- b) Lípidos no absorbidos, tanto de la fracción obtenida por extracción directa como la obtenida tras hidrólisis ácida, procedentes de 2 dietas representativas de las condiciones extremas de alteración:
 - Girasol no calentado 12%
 - Girasol termoxidado 12%

Las determinaciones generales realizadas han sido:

- * Determinación gravimétrica de los lípidos no absorbidos totales.
- * Determinación de la fracción insaponificable.
- * Determinación de la acidez libre.
- * Cuantificación de los ácidos grasos no alterados con patrón interno.
- * Cuantificación de los ácidos grasos alterados (por diferencia).

— RESULTADOS Y DISCUSION —

La Tabla X resume los resultados obtenidos para las determinaciones realizadas sobre las 5 muestras.

En primer lugar, es importante comentar que las cantidades totales de lípidos neutros no absorbidos por 100 g de grasa ingerida son muy superiores en los animales alimentados con grasa alterada (30,1 g) frente a los alimentados con grasa no calentada (8,2 g).

En el análisis efectuado se encuentra un elevado valor para la fracción insaponificable (28,2%) y para los ácidos grasos no alterados (46,8%) cuando la dieta incluye la grasa no calentada mientras que, en contraste, la dieta con grasa alterada se caracteriza por un alto porcentaje de ácidos grasos alterados (65,2%) y cifras mucho menores de fracción insaponificable (8,1%) y de ácidos grasos no alterados (26,7%).

Por otra parte, las cantidades de lípidos obtenidos tras hidrólisis ácida son bajas en relación con los lípidos neutros y destaca la práctica ausencia de fracción insaponificable. Sin embargo, el resultado de mayor importancia es que, en el caso de las grasas termoxidadas, esta fracción está mayoritariamente constituida por productos de alteración, lo que hace que su determinación sea imprescindible si se pretende determinar la cantidad de compuestos de alteración no absorbidos.

Finalmente, el análisis de los lípidos de origen endógeno demuestra la existencia de cantidades totales significativas (0,35 g lípidos / 100 g dieta base desengrasada ingerida) y de una importante contribución de la fracción insaponificable. No obstante, hay que tener en cuenta que estos resultados se han obtenido alimentando los animales con la dieta base, a la que se ha eliminado la grasa según el procedimiento de Söxhlet, utilizado para obtener los lípidos no absorbidos en la primera etapa.

Tabla X.- Características generales de los lípidos no absorbidos
(g/100 g de grasa ingerida)

LÍPIDOS NO ABSORBIDOS	LÍPIDOS TOTALES	% FRACCION INSAPONIFICABLE	% ACIDOS NO ALTERADOS	% ACIDOS ALTERADOS	ACIDEZ (% oleico)
- ENDOGENOS (dieta desengrasada)	-	29,2	52,1	18,7	-
- EXTRACCION DIRECTA (girasol no calentado)	8,2	28,2	46,8	25,0	37,2
- EXTRACCION DIRECTA (girasol termoxidado)	30,1	8,1	26,7	65,1	28,4
- EXT. TRAS HIDROLISIS (girasol no calentado)	1,4	-	38,2	61,8	-
- EXT. TRAS HIDROLISIS (girasol termoxidado)	3,9	-	8,3	91,7	-

La hidrólisis posterior de la dieta base demuestra que existen todavía cantidades significativas de lípidos que, sin embargo, no pueden ser eliminados sin modificar sus características. Por ello, la cantidad obtenida en las heces de los animales experimentales puede proceder, en parte, de lípidos presentes en la dieta que, a su paso por el tracto intestinal, puedan ser liberados.

Teniendo en cuenta las dificultades existentes y, dado el interés de un buen control de los lípidos de origen interno, es necesaria la utilización, en nuevas experiencias, de dietas purificadas exentas de lípidos, lo que facilitará la interpretación de los resultados obtenidos.

b) Aplicación de la sistemática analítica a la evaluación de lípidos no absorbidos

El último paso previo a la cuantificación de los compuestos de alteración no absorbidos es la aplicación de los métodos analíticos desarrollados para grasas comestibles, a las muestras de lípidos con las características generales definidas en el apartado anterior, valorar las separaciones obtenidas y sugerir, en su caso, las modificaciones adecuadas para conseguir resultados fiables.

Con tal fin, se aplica a las mismas muestras seleccionadas en el apartado precedente, cuyas características generales se recogen en la Tabla X, la metodología analítica para la determinación de ácidos monómeros, dímeros y polímeros, según el procedimiento analítico desarrollado en el apartado 2.1.2.3., que incluye las siguientes etapas:

- 1º) Preparación de los ésteres metílicos
- 2º) Separación de los ésteres metílicos por cromatografía en columna de sílice
- 3º) Determinación cuantitativa por cromatografía líquida de exclusión

— RESULTADOS Y DISCUSION —

La Figura 19 muestra, en la parte superior, los cromatogramas obtenidos para la fracción no polar de las muestras de lípidos no absorbidos obtenidas por extracción directa, correspondientes a los animales alimentados con dieta alipídica, girasol no calentado y girasol termoxidado, respectivamente. Es de destacar que aparecen 3 picos en una fracción que, en principio, incluye sólo a los ésteres metílicos de ácidos grasos y dímeros no polares, cuyos tiempos de retención corresponden al superior e inferior, respectivamente, de los reseñados en la figura.

Puesto que la principal diferencia entre estas muestras y las de grasas comestibles se encuentra en el elevado porcentaje de insaponificable de las primeras, es importante conocer las posibilidades de solapamiento de la citada fracción con los ácidos presentes en las muestras que proceden de la grasa de la dieta.

La eliminación previa de la fracción insaponificable da lugar a los cromatogramas que se encuentran en la parte inferior de la figura, para las mismas muestras. La comparación entre cromatogramas permite apreciar claramente el solapamiento debido a componentes del insaponificable y, consecuentemente, la eliminación previa de la fracción insaponificable es una modificación indudablemente necesaria como etapa preliminar a la aplicación del esquema analítico a muestras de lípidos no absorbidos.

Se han omitido los cromatogramas correspondientes a las muestras obtenidas tras hidrólisis puesto que, al carecer éstas de insaponificable, los cromatogramas son idénticos en ambas situaciones y no existen problemas especiales en la cuantificación de los ácidos presentes.

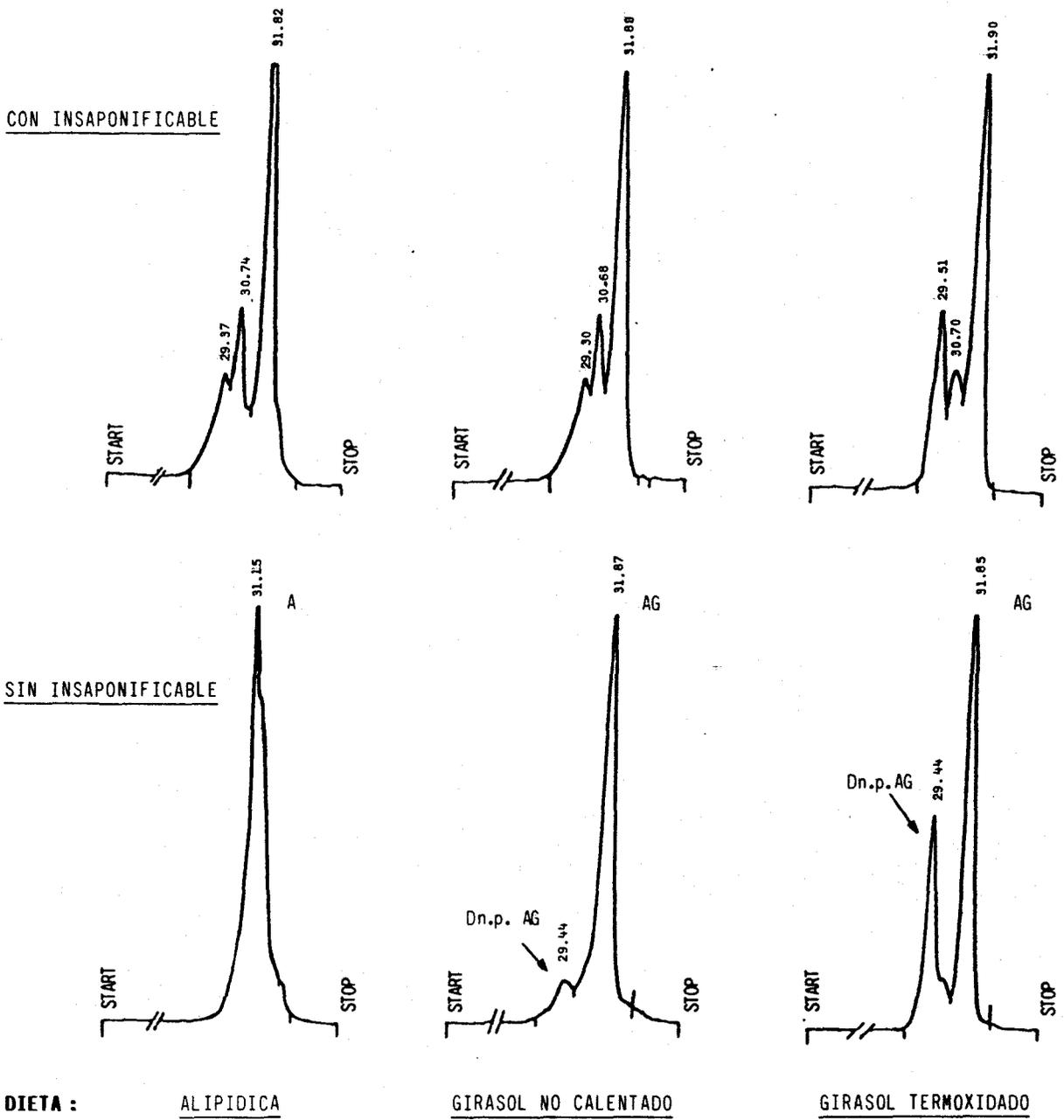


Figura 19.- Cromatogramas representativos de la fracción no polar de lípidos no absorbidos.

2.2.2.4.- SELECCION DE VARIABLES EN LOS ENSAYOS NUTRICIONALES

En el presente apartado se muestran los resultados obtenidos para todas las muestras analizadas, que han sido de gran utilidad para decidir las mejores condiciones de futuros ensayos.

En la Tabla XI se incluyen las cantidades de lípidos no absorbidos totales, durante el periodo controlado, así como los correspondientes valores de digestibilidad aparente. Dos conclusiones destacan a la vista de los resultados obtenidos:

- 1º) El incremento de la alteración de la grasa tiene como consecuencia una disminución de la digestibilidad o un incremento en la cantidad de lípidos excretados.
- 2º) La digestibilidad aumenta conforme aumenta el porcentaje de grasa en la dieta, cuando se utiliza un aceite termoxidado. En el caso de las grasas más alteradas, sin embargo, no se encuentra una evolución coherente.

En nuestra opinión, esta última conclusión es sorprendente ya que, en todo caso, sería de esperar que, con una ingestión excesiva de grasa, la absorción disminuyera, por saturación de la mucosa (189).

Por ello, se piensa que los resultados pueden estar relacionados con la existencia de parámetros o variables no controlados en la experiencia, que se resumen a continuación:

- 1º) La imposibilidad de controlar de forma efectiva la grasa endógena para obtener valores netos de digestibilidad. Puesto que la corrección de la grasa se efectúa utilizando un grupo de animales en idénticas condiciones experimentales pero con la dieta

Tabla XI.- LIPIDOS TOTALES: Cantidades excretadas (g/100 g grasa ingerida) y digestibilidades aparentes (%).

% Aceite en dieta Aceite	LIPIDOS NO ABSORBIDOS						DIGESTIBILIDAD		
	6		12		18		6	12	18
	\bar{x}	$tS_{\bar{x}}$	\bar{x}	$tS_{\bar{x}}$	\bar{x}	$tS_{\bar{x}}$			
(1) *	15,8	3,18	11,3	1,11	5,9	0,95	84,2	88,7	94,1
(2)	20,5	1,43	25,2	2,22	23,6	3,65	79,5	74,8	76,4
(3)	14,0	2,38	9,4	1,43	4,3	0,64	86,0	90,6	95,7
(4)	23,6	3,34	34,5	3,98	27,6	2,54	76,4	65,5	72,4

- * (1): Oliva refinado no calentado
 (2): Oliva refinado termoxidado (100 horas)
 (3): Girasol refinado no calentado
 (4): Girasol refinado termoxidado (100 horas)

exenta de grasa, la corrección a efectuar depende del tiempo en que los animales consumen los 100 g de grasa, sobre los que están expresadas las tasas de digestibilidad. Es decir, cuanto menor sea el porcentaje de grasa en la dieta, tanto más elevada será la cantidad de grasa endógena en los lípidos no absorbidos y, por ello, los valores de digestibilidad neta deberían tender a igualarse. La determinación de la grasa endógena es, por tanto, fundamental para establecer la significación de los resultados.

- 2º) Puesto que los aceites se adicionan a una dieta base que contiene un 3% de grasa, la composición de la grasa de la dieta varía en todos los grupos. El análisis de la grasa de la dieta base, que se recoge en el apartado 2.2.2.1., muestra una mayor alteración que los aceites refinados de oliva y girasol y, por tanto, la grasa total de la dieta está menos alterada cuanto mayor es su proporción, lo que justificaría su menor digestibilidad. En consecuencia, es necesaria una dieta base exenta de grasa, purificada y de composición constante lo que, por una parte, garantizaría la acción exclusiva de las variables que se pretenden estudiar - nivel de grasa y porcentaje de alteración -, y, además, permitiría un control estricto de la grasa de origen interno.
- 3º) La influencia del porcentaje de grasa en la dieta se ha analizado en diferente tiempo y, por tanto, los resultados podrían mostrar también la influencia de la edad de los animales. En consecuencia, sería conveniente establecer grupos de animales independientes.

La Tabla XII recoge las cantidades ingeridas y excretadas de fracción insaponificable, por cada 100 g de grasa ingerida, así como los valores de digestibilidad aparente. Como puede observarse, la fracción insaponificable excretada es siempre superior a la ingerida, lo que implica que una parte significativa de la misma es de origen interno y no relacionado con la dieta.

Es, por tanto, necesario, de nuevo, un buen control de los lípidos de origen endógeno, que permita corregir los resultados.

La Tabla XIII corresponde a las cantidades ingeridas y excretadas de ácidos grasos no alterados, por cada 100 g de grasa ingerida, junto con los valores de digestibilidad aparente. La determinación se lleva a cabo mediante cuantificación con patrón interno.

Las digestibilidades obtenidas son muy superiores a las que se encuentran en los lípidos totales, aunque las conclusiones generales son similares a las deducidas para ellos y, por tanto, son igualmente aplicables las modificaciones que se sugieren en posteriores ensayos, para poder establecer conclusiones definitivas.

Finalmente, no ha sido posible determinar otros grupos de compuestos, ya que las cantidades de lípidos obtenidos durante el periodo experimental de 5 días son insuficientes en algunos casos. En consecuencia, es necesario prolongar los periodos de control en jaula de metabolismo, lo que, por otra parte, debería contribuir a disminuir los errores experimentales, al reducirse el desfase existente entre ingesta y excreta.

En resumen, el planteamiento de esta experiencia ha permitido establecer las modificaciones necesarias en los ensayos, para asegurar una buena cuantificación de los compuestos presentes en la grasa de la dieta, las cuales se resumen a continuación:

- 1º) Utilización de una dieta base alipídica purificada, de composición constante y comprobada en el laboratorio, que permita un riguroso control de los lípidos ingeridos y excretados, así como de los de origen endógeno. De esta forma se garantiza la acción exclusiva de las variables que se pretenden estudiar - nivel de alteración y porcentaje de grasa -.

Tabla XII.- FRACCION INSAPONIFICABLE: Cantidades ingeridas, excretadas (g/100 g de grasa ingerida) y digestibilidades aparentes (%).

% Aceite en dieta Aceite	INGERIDO			EXCRETADO			DIGESTIBILIDAD		
	6	12	18	6	12	18	6	12	18
(1) *	3,4	2,1	1,6	4,6	2,8	2,0	-35,3	-33,3	-25,0
(2)	3,2	1,9	1,4	4,5	3,2	2,1	-40,6	-40,6	-50,0
(3)	3,4	2,1	1,6	4,5	2,6	1,5	-32,3	-23,8	+6,2
(4)	3,2	1,9	1,4	4,3	3,4	2,0	-34,4	-78,9	-42,8

Tabla XIII.- ACIDOS GRASOS NO ALTERADOS: Cantidades ingeridas, excretadas (g/100 g de grasa ingerida) y digestibilidades aparentes (%).

% Aceite en dieta Aceite	INGERIDO			EXCRETADO			DIGESTIBILIDAD		
	6	12	18	6	12	18	6	12	18
(1) *	93,0	96,0	97,1	8,4	6,0	3,2	91,0	93,7	96,7
(2)	74,1	67,0	64,6	8,0	9,7	8,7	89,2	85,5	86,5
(3)	92,4	94,3	96,0	7,2	5,5	2,1	92,2	94,2	97,8
(4)	71,2	62,2	59,8	10,7	17,8	12,6	85,0	71,4	79,0

* Para claves ver Tabla XI.

2º) Establecimiento de grupos diferenciados de animales para cada una de las combinaciones de las dos variables estudiadas, para eliminar la influencia de la edad de los mismos. El diseño factorial establecido permite, por otra parte, analizar las posibilidades de interacción entre las dos variables elegidas.

No se ha considerado necesario, sin embargo, aumentar el número de animales por grupo, ya que las nuevas condiciones establecidas en los ensayos deben contribuir a disminuir las desviaciones encontradas que, por otra parte, se consideran aceptables en relación con el objetivo de este estudio.

3º) Periodos de control de 15 días de duración, tiempo necesario para obtener suficientes cantidades de muestras de lípidos y minimizar las consecuencias negativas debidas al desfase existente entre ingesta y excreta.

4º) Utilización de un único aceite, que garantice un riguroso control de la composición en productos alterados, lo cual se considera fundamental pues, como ya se ha comprobado, las variaciones en las digestibilidades están más relacionadas con las cantidades de compuestos de alteración que con el tipo de aceite.

La obtención de un nivel intermedio, por mezcla del aceite no alterado y el alterado, asegura así igual composición cualitativa y un distinto nivel cuantitativo para los productos alterados.

**2.2.3.- Experiencia principal: determinación
cuantitativa de lípidos no absorbidos**

El objetivo de esta experiencia, considerada como principal, ha sido la determinación de las tasas de absorción de compuestos específicos de alteración. A tal efecto, se han aplicado las modificaciones necesarias para obtener mejoras sustanciales, tanto en el planteamiento de la experiencia como en la metodología analítica desarrollada, modificaciones que resultan como consecuencia de la experiencia realizada anteriormente (Apartado 2.2.2.).

En definitiva, la utilización del esquema analítico desarrollado, cuya aplicabilidad a lípidos no absorbidos ha sido previamente demostrada, proporciona una metodología nueva y particularmente adecuada para la cuantificación de compuestos de alteración específicos en estas muestras y ello, unido a la determinación de los mismos en las grasas de las dietas, constituye una buena base para evaluar, indirectamente, las tasas de absorción de compuestos específicos de alteración.

La indiscutible necesidad de aplicar factores de corrección a los lípidos no absorbidos, en base a los lípidos endógenos excretados, nos ha conducido a la realización previa de una completa caracterización de los lípidos excretados de origen endógeno.

En conclusión, con los propósitos arriba mencionados, se ha planteado una ambiciosa experiencia cuyo desarrollo y resultados obtenidos se exponen detalladamente en este apartado.

2.2.3.1.- PLANTEAMIENTO DE LA EXPERIENCIA

El planteamiento de la experiencia recoge todas las modificaciones deducidas del ensayo previo, que se resumieron al final del apartado 2.2.2.4.

a) Animales y tratamientos

La experiencia se ha llevado a cabo con ratas macho de la cepa Wistar, con un peso inicial de 100 g aproximadamente, distribuidas en 10 lotes homogéneos constituidos por 4 animales cada uno, incluyendo un grupo control.

Los animales fueron alimentados con una dieta base alipídica a la que se incorporó aceite puro de oliva, combinando distintos valores para las dos variables de mayor interés: nivel de compuestos de alteración en la dieta y porcentaje de grasa en la misma. Los niveles de grasa seleccionados han sido 6,12 y 20% y los niveles de alteración los correspondientes al aceite de oliva puro fresco, al mismo, alterado en condiciones termoxidativas a 190°C durante 150 horas y a una mezcla de ambos al 50%.

La composición de la dieta base se resume a continuación:

- HUMEDAD	10,0%
- PROTEINAS	19,8%
(caseína)	
- EXTRACTO LIBRE DE NITROGENO	57,6%
(glucosa + almidón)	
- CELULOSA	5,4%
- MINERALES	6,2%
- COMPLEJO VITAMINICO	1,0%

Las determinaciones analíticas realizadas en los aceites se recogen en las 3 últimas columnas de las Tablas V y VI.

Se han controlado estrictamente las condiciones de preparación y conservación de las dietas. Con objeto de evitar su deterioro, se prepararon semanalmente y se envasan en frascos herméticamente cerrados, con nitrógeno, que se conservan en frigorífico (4°C) hasta el momento de su administración a los animales.

La duración total del ensayo ha sido de 5 meses, a lo largo de los cuales fueron controlados en jaulas de metabolismo los diferentes grupos de animales, durante periodos de 15 días, con 3 días de adaptación previa. El grupo control se alimentó con la dieta base alipídica durante 2 periodos de 15 días, al comienzo y al final de la experiencia global.

Durante el periodo experimental los animales se mantuvieron en jaulas de metabolismo individuales, que permiten cuantificar la ingesta y las excreciones fecal y urinaria. A lo largo de este periodo, los animales ingirieron "ad libitum" agua y su dieta correspondiente, realizando un control riguroso de las cantidades ingeridas y excretadas diariamente. Así mismo, el seguimiento de los animales durante la experiencia ha incluido frecuentes controles de la evolución ponderal, signos externos y datos macroscópicos. Las heces fueron recogidas y pesadas diariamente, y mantenidas en congelador hasta el momento de su extracción.

La distribución de los animales en las jaulas de metabolismo ha sido realizada en las condiciones más desfavorables, introduciendo, en cada periodo experimental, un animal de cada grupo, con objeto de garantizar que las diferencias entre grupos no dependen del momento en que los animales son controlados.

b) Metodología analítica

Se establece como metodología analítica definitiva la expuesta en el apartado 2.1.2.2., que ya incluye todas las modificaciones necesarias para lograr una rigurosa cuantificación de los grupos de compuestos de alteración.

Los puntos más importantes a destacar, deducidos de la experiencia previa, son los resumidos a continuación:

- 1º) En relación con las etapas previas al análisis, es necesaria la extracción de los lípidos no absorbidos, tras hidrólisis ácida, ya que, aunque su importancia cuantitativa pudiera ser mínima, en el caso de las grasas termoxidadas, se haya constituida fundamentalmente por productos de alteración no absorbidos.

- 2º) En cuanto a las modificaciones del esquema analítico desarrollado para grasas comestibles, es necesaria la eliminación previa de fracción insaponificable, para evitar interferencias en la de terminación de los compuestos específicos de alteración durante la separación de éstos por cromatografía líquida de exclusión.

2.2.3.2.- CARACTERIZACION DE LIPIDOS DE ORIGEN ENDOGENO

La interferencia producida por los lípidos de origen endógeno en la evaluación cuantitativa de la grasa de la dieta no absorbida, hace necesario el conocimiento de las cantidades globales excretadas y de los principales constituyentes de los lípidos de heces de animales alimentados con la dieta exenta de grasa. Este conocimiento es de gran utilidad para aplicar factores de corrección a los lípidos excretados de los diferentes grupos de animales y obtener así valores más representativos de la grasa de la dieta no absorbida.

Con esta finalidad, se ha alimentado un grupo de 4 animales con la dieta alipídica, durante dos periodos experimentales de 15 días, al comienzo de la experiencia global y al final de la misma, con objeto de obtener cantidades suficientes de muestras y, además, analizar si existen variaciones significativas durante el periodo en que se lleva a cabo la experiencia global.

La ausencia de lípidos en la dieta fue comprobada en el laboratorio. Tras la extracción de 2 muestras de 100 g, las cantidades de residuo obtenido son inferiores al 0,01%, lo que garantiza su idoneidad como dieta base para los distintos grupos de animales y para la determinación de lípidos de origen estrictamente endógeno.

Determinaciones analíticas

Junto a la determinación gravimétrica de los lípidos endógenos totales excretados, se ha cuantificado, en todas las muestras, la fracción insaponificable y los ácidos grasos, éstos últimos utilizando heptadecanoato de metilo como patrón interno. Los ácidos polares han sido deducidos, finalmente, por diferencia.

Debido a las pequeñas cantidades de lípidos obtenidas

y a la elevada cantidad de materia insaponificable presente en las mismas, la separación y cuantificación mediante las técnicas cromatográficas de adsorción y exclusión se han aplicado, por duplicado, sobre una única muestra obtenida a partir de las fracciones saponificables de las 8 muestras iniciales.

La separación e identificación de los principales ácidos presentes en los lípidos endógenos se ha llevado a cabo mediante cromatografía gas líquido - espectrometría de masas (CGL-EM), utilizando una columna capilar de sílice fundida (30 m x 0,03 mm. d.i.) de SBP-1. Las mejores separaciones se obtienen utilizando temperatura programada entre 210 y 270°C, con velocidad de programación de 2°C/min y 4 minutos de isoterma inicial. Para la identificación de los ácidos presentes en la fracción de menor polaridad se ha utilizado también una columna capilar, de SP-2330, a temperatura de 200°C.

— RESULTADOS Y DISCUSION —

La Tabla XIV recoge los resultados obtenidos para todas las muestras de lípidos endógenos. Puesto que no existen diferencias significativas debido a la edad de los animales, se ha calculado la media de todos los valores así como sus límites de confianza.

La excelente reproducibilidad encontrada, sorprendente si se considera que los resultados provienen de distintos animales, es una garantía de que la corrección, utilizando valores medios, no contribuye significativamente a incrementar el error, cuando se calculan las tasas corregidas de digestibilidad. En relación con este punto, la Figura 20 muestra los cromatogramas obtenidos mediante cromatografía de exclusión, para el insaponificable, los ácidos no alterados y los ácidos polares, donde puede comprobarse que los compuestos presentes en los lípidos endógenos tienen pesos moleculares inferiores a los dímeros de ácidos grasos y que, por ello, dentro de los grupos de compuestos que van a ser cuantificados posteriormente, sólo es necesario corregir los

Tabla XIV.- LIPIDOS DE ORIGEN ENDOGENO: Cantidades excretadas (g) durante el periodo experimental

	RATAS	TOTAL	FRACCION INSAPONIFICABLE	ACIDOS GRASOS NO ALTERADOS	ACIDOS * POLARES
15 - 30 ENERO	1	0,42	0,26	0,16	-
	2	0,48	0,31	0,12	0,05
	3	0,36	0,21	0,08	0,07
	4	0,35	0,21	0,10	0,04
15 - 30 MAYO	1	0,44	0,29	0,10	0,05
	2	0,36	0,19	0,09	0,08
	3	0,38	0,23	0,12	0,03
	4	0,40	0,27	0,08	0,05
	\bar{x}	0,39	0,25	0,11	0,04
	** $tS_{\bar{x}}$	0,038	0,035	0,021	-

* Calculados por diferencia a 100

** t = 2,365

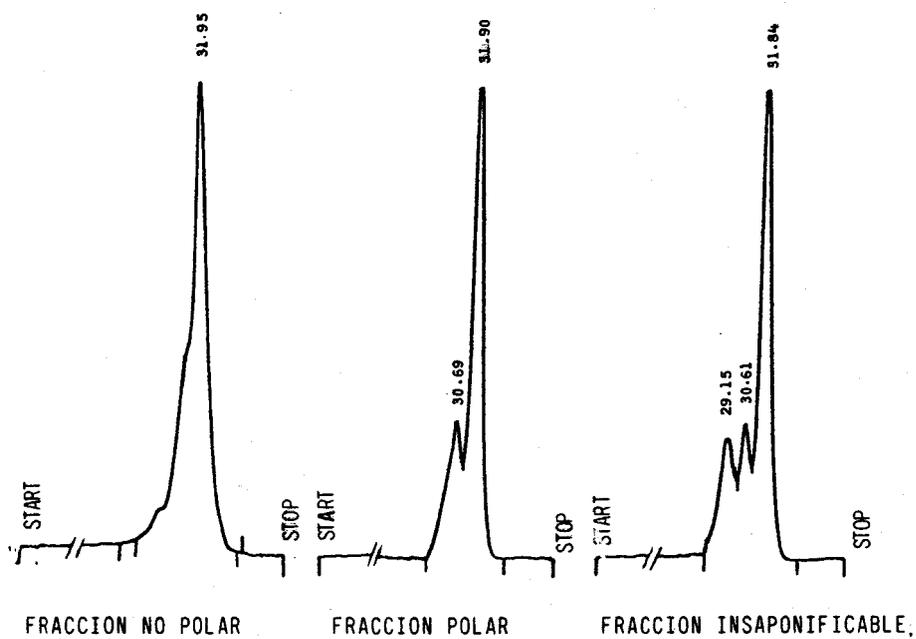


Figura 20.- Cromatogramas obtenidos para los lípidos de origen endógeno.

lípidos totales, el insaponificable, los ácidos grasos no alterados y los ácidos monómeros oxidados.

Las correcciones aplicadas, por día, a los distintos grupos de compuestos no absorbidos de la grasa de la dieta, se recogen en la última fila de la Tabla XIV. Como puede observarse, más de la mitad de los lípidos endógenos pertenecen a la fracción insaponificable (62,1%). Su evaluación cualitativa mediante cromatografía en capa fina permite apreciar la existencia de, al menos, 20 bandas, entre las que destacan las que incluyen al colesterol y al coprostanol, cuya cuantificación se realiza posteriormente en el apartado 2.3.1.

El siguiente grupo de compuestos de importancia cuantitativa está constituido por los ácidos no polares, que suponen aproximadamente un 27% del total de los lípidos endógenos. Su separación e identificación mediante CGL-EM permite deducir que este grupo de compuestos incluye un elevado número de ácidos de longitud de cadena par e impar, comprendida entre 14 y 28 átomos de carbono, predominando los ácidos saturados sobre los insaturados, los de cadena par sobre los de cadena impar y los de la serie normal sobre los ramificados. Un cromatograma representativo de los mismos se encuentra en la Figura 21, donde se especifican los ácidos identificados.

La presencia del ion molecular ha permitido asignar fácilmente el número de átomos de carbono y de insaturaciones, mientras que el tiempo de retención cromatográfico y la relación, mayor que 1, entre la abundancia relativa de los fragmentos M-29 y M-31 ha servido para deducir claramente la existencia de la serie anteiso (190) (191).

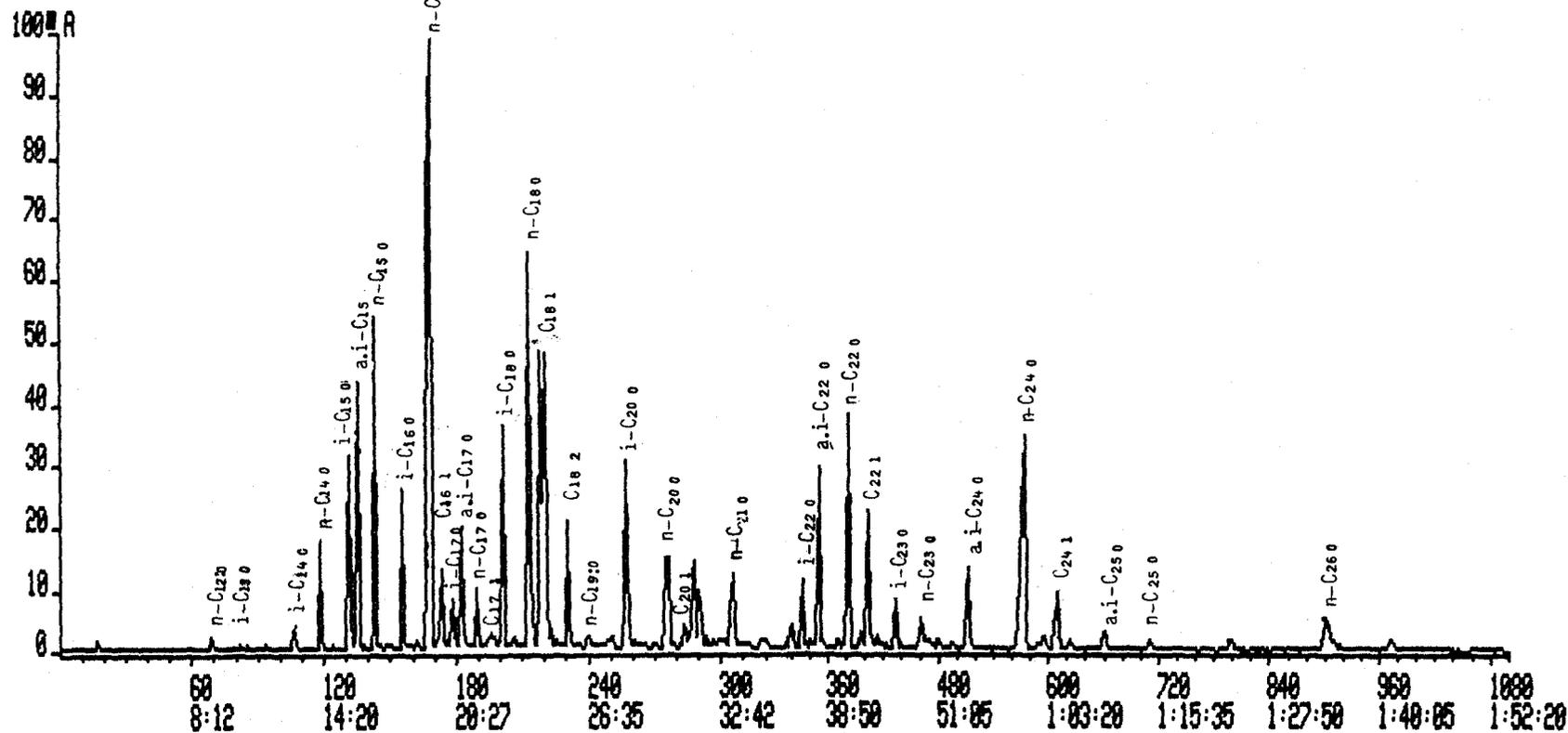
Finalmente, los compuestos mayoritarios entre los ácidos polares, que constituyen un 8-9% de la muestra, son, principalmente, ácidos con pesos moleculares semejantes a los ácidos grasos, como puede deducirse del cromatograma obtenido por cromatografía de exclusión (Fig.20). El pico de tiempo de retención inferior es similar al que se obtiene para el ácido cólico, lo que indica que podría corresponder a los ácidos biliares.

12 #1-1134 1-FEB-89 14:11 MS30 (EI+)

1-FEB-89 14:11 MS30 (EI+)

Sys:SYSTEMDEF

A:ATIC
Text:



1.00
8022

Figura 21.- Esteres metílicos de ácidos no polares presentes en los lípidos de origen endógeno. Cromatograma de la corriente iónica total.

Sólo se han identificado mediante CGL-EM los componentes mayoritarios que eluyen en cromatografía gas-líquido, cuyos espectros de masa corresponden a los 2 y 3 hidroxieúteres de 16,17,18 y 19 átomos de carbono, como se muestra en la Figura 22, donde se recoge el cromatograma obtenido.

La asignación de estructuras ha sido sencilla ya que en los espectros de los 2 hidroxieúteres aparece el ion molecular, y es fácilmente perceptible la diferencia entre los isómeros debido a la elevada intensidad del fragmento M-59 en el caso de los 2 hidroxieúteres y la presencia del fragmento m/e 103 como pico base, para los 3 hidroxieúteres.

En resumen, los lípidos de origen endógeno están fundamentalmente constituidos por componentes del insaponificable, que provienen fundamentalmente de las secreciones hepática e intestinal, y por ácidos grasos, mayoritariamente de baja polaridad, característicos de los microorganismos de la flora intestinal.

5 #1-310 8-JUL-88 09:41 MS30 (EI+) Sys:SYSTEMDEF
A:ATIC B0:103 C0:90 D0:314
Text:FII ALIPIDICA (METIL HIDROXIACIDOS)

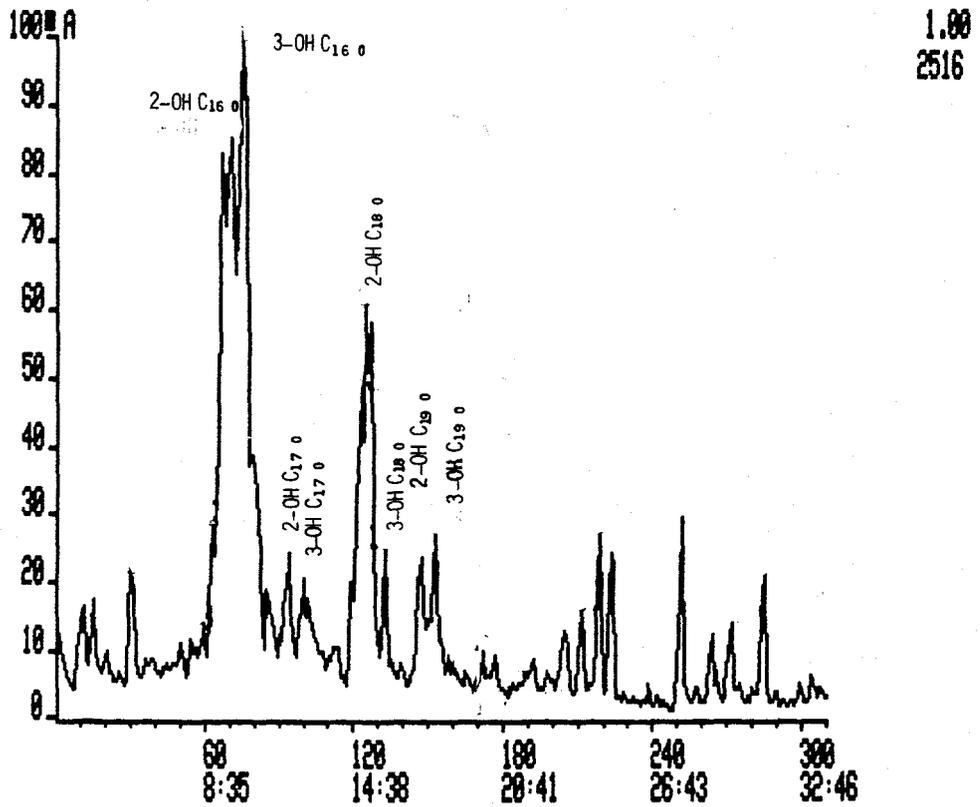


Figura 22.- Esteres metílicos de ácidos polares presentes en los lípidos de origen endógeno. Cromatograma de la corriente iónica total.

2.2.3.3.- CUANTIFICACION DE COMPUESTOS NO ABSORBIDOS

Conocida la contribución de los lípidos de origen endógeno, es ya posible abordar directamente el objetivo central de esta parte del trabajo, consistente en la determinación cuantitativa de compuestos específicos y sus correspondientes tasas de absorción.

Los resultados que se van a discutir han sido obtenidos, como en el caso de los lípidos de origen endógeno, a partir del análisis de los lípidos no absorbidos de cada uno de los animales experimentales, y han permitido obtener conclusiones para los siguientes grupos de compuestos:

- * Lípidos totales
- * Fracción insaponificable
- * Acidos grasos no alterados
- * Acidos grasos alterados:
 - monómeros oxidados
 - dímeros no polares
 - dímeros oxidados
 - polímeros térmicos y oxidativos

2.2.3.3.1.- Lípidos totales

Las Tablas XV, XVI y XVII recogen las cantidades de lípidos ingeridos y excretados para la totalidad de los animales. En lo que se refiere a los lípidos excretados, en las citadas tablas figuran los datos correspondientes a los lípidos extraídos directamente y a los obtenidos tras hidrólisis ácida, a la suma de ambos, que constituye el total de los lípidos excretados, así como dicho valor corregido tras aplicar el factor correspondiente a la media de lípidos endógenos excretados en 12 días.

La Tabla XVIII corresponde al análisis de varianza aplicado a los resultados obtenidos para 100 g de grasa consumida,

Tabla XV.- LIPIDOS TOTALES: Cantidades ingeridas y excretadas durante el periodo experimental (g)
(6% de grasa en la dieta)

ACEITE DE OLIVA	ACEITE INGERIDO	LIPIDOS EXCRETADOS			LIPIDOS EXCRETADOS corregidos
		Extracción directa	Extracción tras hidrólisis ácida	Lípidos totales	
F *	18,36	0,42	0,90	1,32	1,01
	20,36	0,53	0,84	1,37	1,05
	17,08	0,48	0,53	1,01	0,70
	19,32	0,62	0,91	1,53	1,21
F + C	18,02	1,80	1,28	3,08	2,76
	19,61	1,45	1,36	2,81	2,49
	17,65	2,02	1,03	3,05	2,74
	17,39	1,65	1,10	2,75	2,44
C	18,24	3,63	2,20	5,83	5,51
	18,26	3,77	2,14	5,91	5,56
	19,15	3,38	2,19	5,57	5,26
	15,87	2,35	2,01	4,36	4,04

* F = Aceite de oliva fresco (no calentado)

C = Aceite de oliva calentado (termoxidado 150 horas)

F + C = Mezcla al 50% de F y C

Tabla XVI.- LIPIDOS TOTALES: Cantidades ingeridas y excretadas durante el periodo experimental (g)
(12% de grasa en la dieta)

ACEITE DE OLIVA	ACEITE INGERIDO	LIPIDOS EXCRETADOS			LIPIDOS EXCRETADOS corregidos
		Extracción directa	Extracción tras hidrólisis ácida	Lípidos totales	
F *	32,92	0,77	0,88	1,65	1,33
	32,92	0,93	0,91	1,84	1,53
	33,01	0,81	0,78	1,57	1,25
	31,13	0,96	0,64	1,59	1,28
F + C	37,52	3,83	1,47	5,30	4,99
	30,68	3,22	1,57	4,79	4,47
	40,95	3,69	2,03	5,72	5,40
	34,01	4,08	1,55	5,63	5,32
C	37,91	9,93	2,17	12,10	11,77
	34,30	8,25	1,75	10,00	9,69
	33,39	8,00	1,80	9,80	9,48
	35,27	8,97	1,78	10,75	10,43

* Para claves ver Tabla XV.

Tabla XVII.- LIPIDOS TOTALES: Cantidades ingeridas y excretadas durante el periodo experimental (g)
(20% de grasa en la dieta)

ACEITE DE OLIVA	ACEITE INGERIDO	LIPIDOS EXCRETADOS			LIPIDOS EXCRETADOS corregidos
		Extracción directa	Extracción tras hidrólisis ácida	Lípidos totales	
F *	36,52	0,82	0,61	1,43	1,12
	36,49	0,66	0,80	1,46	1,15
	32,76	0,45	0,76	1,21	0,89
	52,34	1,91	0,95	2,86	2,54
F + C	40,64	5,99	1,10	7,09	6,77
	43,93	6,68	0,87	7,55	7,19
	43,71	5,91	1,01	6,92	6,60
	53,95	8,29	1,13	9,42	9,11
C	51,64	12,31	2,27	14,58	14,22
	49,15	13,79	2,03	15,82	15,50
	40,57	9,10	1,83	10,93	10,62
	51,13	15,68	1,93	17,61	17,30

* Para claves ver Tabla XV.

Tabla XVIII.- Análisis de varianza

CAUSAS DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADO MEDIO	F' (calculado)	F (nivel 0,05)
<u>Entre niveles de grasa</u>	2,56	2	1,28	0,45	3,35
<u>Entre niveles de alteración</u>	3747,40	2	1873,70	659,75	3,35
<u>Interacción: Nivel de grasa</u> <u>- Nivel de alteración</u>	18,52	4	4,63	1,63	2,73
<u>Dentro de los subgrupos</u>	76,67	27	2,84		
<u>Interacción + Error ensayo</u>	96,19	31	3,07		
TOTALES	3845,16	35			

donde se pone de manifiesto que la diferencia entre niveles de grasa no es significativa, pero la variación entre niveles de alteración lo es para $P < 0,01$. Por otra parte, la interacción aparente entre nivel de grasa y nivel de alteración puede explicarse totalmente por el error experimental, es decir, no existe una interacción verdadera entre ambas variables. Es de destacar que los resultados del análisis de varianza realizado sobre los lípidos totales antes de efectuar la corrección debida a la grasa endógena, muestra diferencias significativas debido al nivel de grasa en la dieta, lo que demuestra la posibilidad de obtener resultados distintos según los datos básicos utilizados para la evaluación. La corrección realizada elimina las diferencias debido a la mayor cantidad de grasa endógena excretada cuanto menor es el porcentaje de grasa ya que, es conveniente recordar que la citada corrección depende exclusivamente del periodo de tiempo en que, en cada caso, los animales ingieran 100 g de grasa.

La Tabla XIX muestra los valores medios de los lípidos netos totales por cada 100 g de grasa consumida, así como las digestibilidades obtenidas tras la aplicación de la fórmula:

$$\text{Digestibilidad neta o corregida} = \frac{\text{Lip. ingeridos} - (\text{Lip. excretados} - \text{Lip. endógenos})}{\text{Lip. ingeridos}} \times 100$$

Es importante destacar que, mientras que para las grasas no alteradas los valores de digestibilidad alcanzados son muy altos, en cambio las grasas más alteradas presentan unos valores particularmente bajos, que supone un incremento de 7 a 10 veces en los lípidos no absorbidos. Como puede observarse, por otra parte, los resultados correspondientes a la mezcla al 50% de grasa no alterada y alterada son intermedios y, aproximadamente, los correspondientes a la mezcla teórica. En consecuencia, los datos reflejan que la disminución de la digestibilidad está directamente relacionada con el incremento de la concentración

Tabla XIX.- LIPIDOS TOTALES: Cantidades excretadas (\bar{x}')
y digestibilidades (D) corregidas.

% ACEITE EN ACEITE DE OLIVA	6		12		20	
	\bar{x}'	D	\bar{x}'	D	\bar{x}'	D
(1) NO CALENTADO	5,26	94,7	4,12	95,9	3,45	96,5
(2) MEZCLA 50% de (1) y (3)	14,39	85,6	14,17	85,8	16,28	83,7
(3) TERMOXIDADO 150 horas	28,45	71,5	29,32	70,7	29,79	70,2

en productos alterados en la dieta, hecho fácilmente comprensible si consideramos la participación de moléculas alteradas de alto peso molecular en las grasas termoxidadas, que podrían encontrar dificultades para atravesar la barrera intestinal.

2.2.3.3.2.- Fracción insaponificable

La Tabla XX recoge las cantidades medias y sus límites de confianza, para la fracción insaponificable excretada por los distintos grupos, utilizando como base 100 g de grasa ingerida. La última columna indica la cantidad de insaponificable ingerido que es, en todos los grupos, muy inferior a la excretada, lo que demuestra la importancia del insaponificable de origen endógeno.

La Tabla XXI recoge los valores de insaponificable neto (\bar{x}'), obtenidos restando de los valores medios los correspondientes al insaponificable endógeno, y las digestibilidades corregidas, para la fracción insaponificable, en los diferentes grupos.

En primer lugar, entre todos los resultados obtenidos, destaca especialmente que los valores de las digestibilidades sean negativos, a excepción de los correspondientes a aceites frescos; es decir, aún aplicando las correcciones en base a la participación endógena, las cantidades excretadas superan a las ingeridas. Ello indica que las correcciones que han sido aplicadas son inferiores al insaponificable endógeno realmente presente.

Por otra parte, resulta especialmente significativo el aumento de las cantidades excretadas a medida que aumenta la alteración, hecho que no deja de resultar sorprendente, pues es en este sentido precisamente, en el que disminuye el insaponificable ingerido en la dieta.

La conclusión más evidente es que existe una estrecha relación entre los lípidos endógenos y la composición de la dieta ingerida.

Tabla XX.- FRACCION INSAPONIFICABLE: Cantidades ingeridas y excretadas (g/100 g de grasa ingerida)

% ACEITE EN ACEITE EN DIETA DE OLIVA	EXCRETADO						INGERIDO
	6		12		20		
	\bar{x}	$tS_{\bar{x}}$	\bar{x}	$tS_{\bar{x}}$	\bar{x}	$tS_{\bar{x}}$	
(1) NO CALENTADO	1,66	0,41	1,15	0,16	1,07	0,22	0,89
(2) MEZCLA 50% de (1) y (3)	2,23	0,64	1,29	0,10	1,25	0,19	0,70
(3) TERMOXIDADO 150 horas	2,60	0,41	1,60	0,22	1,29	0,25	0,57

Tabla XXI.-FRACCION INSAPONIFICABLE: Cantidades excretadas (\bar{x}') y digestibilidades (D) corregidas.

% ACEITE EN ACEITE EN DIETA DE OLIVA	6		12		20	
	\bar{x}'	D	\bar{x}'	D	\bar{x}'	D
	(1) No calentado	0,62	30,3	0,55	38,2	0,56
(2) Mezcla 50% de (1) y (3)	1,15	-64,3	0,74	-5,7	0,81	-15,7
(3) Termoxidado 150 horas	1,50	-163,1	1,04	-82,4	0,88	-54,4

En el apartado 2.3.1. se analiza en profundidad este aspecto, que ha permitido demostrar la interacción existente utilizando dos criterios diferentes.

2.2.3.3.3.- Ácidos grasos no alterados

La Tabla XXII corresponde a las cantidades medias y límites de confianza de los ácidos grasos no alterados no absorbidos por cada 100 g de grasa ingerida.

La Tabla XXIII recoge los resultados correspondientes a los valores obtenidos eliminando los ácidos grasos de origen endógeno, así como las digestibilidades corregidas.

Del análisis de los resultados se deducen los siguientes puntos:

- 1º) Los valores de digestibilidad son muy elevados en todos los casos y siempre superiores a los obtenidos para los lípidos no absorbidos totales. En el caso de los grupos que consumen aceite no calentado se encuentran muy próximos a 100.
- 2º) No existen diferencias apreciables cuando se administran distintos porcentajes de grasa en la dieta.
- 3º) Resulta particularmente interesante el hecho de que los valores de digestibilidad disminuyan a medida que aumenta la degradación de la grasa ingerida, pues en principio se podría esperar, dadas las elevadas tasas de absorción de los ácidos grasos, que su digestibilidad fuera independiente del nivel de alteración. Los resultados confirman, sin embargo, que la menor digestibilidad de la grasa no se debe sólo a los compuestos de alteración sino, al mismo tiempo, a un menor aprovechamiento de las moléculas de ácidos grasos no alterados. Teniendo en cuenta que antes de

Tabla XXII.- ACIDOS GRASOS NO ALTERADOS: Cantidades ingeridas y excretadas (g/100 g de grasa ingerida)

% ACEITE EN ACEITE EN DIETA DE OLIVA	EXCRETADO						INGERIDO	
	6		12		20		\bar{x}	$tS_{\bar{x}}$
	\bar{x}	$tS_{\bar{x}}$	\bar{x}	$tS_{\bar{x}}$	\bar{x}	$tS_{\bar{x}}$		
(1) NO CALENTADO	1,13	0,29	1,67	0,35	1,42	0,38	98,5	0,15
(2) MEZCLA 50% de (1) y (3)	3,51	1,49	3,46	1,14	4,07	1,01	81,5	0,40
(3) TERMOXIDADO 150 horas	7,30	0,54	7,13	0,79	6,59	1,34	65,3	0,29

Tabla XXIII.- ACIDOS GRASOS NO ALTERADOS: Cantidades excretadas (\bar{x}') y digestibilidades (D) corregidas

% ACEITE EN ACEITE EN DIETA DE OLIVA	6		12		20	
	\bar{x}'	D	\bar{x}'	D	\bar{x}'	D
(1) No calentado	0,67	99,3	1,41	98,6	1,20	98,8
(2) Mezcla 50% de (1) y (3)	3,04	96,3	3,22	96,0	3,88	95,2
(3) Termoxidado 150 horas	6,82	89,6	6,89	89,4	6,41	90,2

la absorción propiamente dicha tiene lugar la hidrólisis del triglicérido, sería de gran interés definir si la menor digestibilidad de los ácidos grasos se debe a dificultades específicas en la etapa de hidrólisis previa.

Los métodos desarrollados en este trabajo han permitido plantear estudios específicos que se detallan en el apartado 2.3.2., para establecer tanto "in vitro" como "in vivo" las posibilidades de acción de la lipasa pancreática sobre moléculas complejas de triglicéridos así como cuantificar específicamente los ácidos grasos que se encuentran libres y los que permanecen unidos al resto glicerídico.

2.2.3.3.4.- Acidos monómeros oxidados

La Tabla XXIV corresponde a las cantidades medias y sus límites de confianza de los ácidos monómeros oxidados no absorbidos por cada 100 g de grasa ingerida.

La Tabla XXV recoge los resultados correspondientes a los valores obtenidos eliminando los ácidos de origen endógeno, así como las digestibilidades netas.

Es de destacar que, en relación con los resultados obtenidos para grupos analizados previamente - lípidos totales, insaponificable y ácidos no alterados -, no se encuentran en este caso diferencias significativas debido al nivel de alteración. Los valores de digestibilidad obtenidos son, por otra parte, muy elevados, estando la mayoría comprendidos entre el 70% y el 80%.

En este grupo están incluidos, fundamentalmente, los compuestos originados por vía oxidativa a baja temperatura - hidroperóxidos, ceto e hidroxíácidos y compuestos monoméricos polifuncionales -. Las elevadas tasas de absorción de los ácidos oxidados monómeros, superior a cualquier otro grupo de compuestos de alteración, y su presencia

Tabla XXIV.- ACIDOS MONOMEROS OXIDADOS: Cantidades ingeridas y excretadas (g/100g de grasa ingerida)

% ACEITE EN ACEITE EN DIETA DE OLIVA	EXCRETADO						INGERIDO	
	6		12		20		\bar{x}	$S_{\bar{x}}$
	\bar{x}	$tS_{\bar{x}}$	\bar{x}	$tS_{\bar{x}}$	\bar{x}	$tS_{\bar{x}}$	\bar{x}	$S_{\bar{x}}$
(1) NO CALENTADO	-		-		-		-	
(2) MEZCLA 50% de (1) y (3)	1,12	0,45	0,99	0,48	0,91	0,19	4,62	0,16
(3) TERMOXIDADO 150 horas	2,41	1,08	2,80	0,83	2,30	0,60	8,68	0,18

Tabla XXV.- ACIDOS MONOMEROS OXIDADOS: Cantidades excretadas (\bar{x}') y digestibilidades (D) corregidas.

% ACEITE EN ACEITE EN DIETA DE OLIVA	6		12		20	
	\bar{x}'	D	\bar{x}'	D	\bar{x}'	D
(1) No calentado	-		-		-	
(2) Mezcla 50% de (1) y (3)	0,93	79,7	0,89	80,7	0,84	81,8
(3) Termoxidado 150 horas	2,21	74,5	2,70	68,9	2,23	74,3

en cantidades apreciables en las grasas termoxidadas que son consumidas en la dieta, les convierte en el grupo de mayor interés, desde el punto de vista nutricional, para realizar estudios posteriores que permitan conocer su acción en el organismo una vez absorbidos.

2.2.3.3.5.- Ácidos dímeros no polares

La Tabla XXVI recoge los resultados correspondientes a las cantidades medias y sus límites de confianza, de los ácidos dímeros no polares no absorbidos por cada 100 g de grasa ingerida, así como los valores correspondientes de digestibilidad.

Los valores de digestibilidad obtenidos son, independientemente del nivel de alteración y del porcentaje de grasa en la dieta, muy bajos, y en algunos casos, los límites de confianza incluyen el 0. Estos resultados parecen indicar que el tamaño molecular del ácido dímero, similar al diglicérido, es demasiado elevado para atravesar la membrana intestinal, la cual, como es sabido, posee una notable selectividad de absorción.

2.2.3.3.6.- Ácidos dímeros oxidados

La Tabla XXVII muestra las cantidades medias y sus límites de confianza, de los ácidos dímeros oxidados no absorbidos por cada 100 g de grasa ingerida, así como los valores de digestibilidad obtenidos.

La comparación de los valores de digestibilidad encontrados para los ácidos dímeros oxidados y los dímeros no polares demuestra la existencia de diferencias para ambos grupos de compuestos, ya que los valores incluidos en la Tabla XXVII son significativamente distintos de 0 en todos los grupos.

Tabla XXVI.- ACIDOS DIMEROS NO POLARES: Cantidades excretadas, ingeridas y digestibilidades.

% ACEITE EN ACEITE EN DIETA DE OLIVA	EXCRETADO						INGERIDO	
	6		12		20		\bar{x}	$tS_{\bar{x}}$
	\bar{x}	$tS_{\bar{x}}$	\bar{x}	$tS_{\bar{x}}$	\bar{x}	$tS_{\bar{x}}$	\bar{x}	$tS_{\bar{x}}$
(1) NO CALENTADO	-		-		-		-	
(2) MEZCLA 50% de (1) y (3)	1,58	0,35 (15,5)*	1,65	0,30 (11,8)	1,63	0,25 (12,8)	1,87	0,06
(3) TERMOXIDADO 150 horas	3,18	0,56 (13,4)	3,73	0,22 (-1,6)	3,52	0,31 (4,1)	3,67	0,11

Tabla XXVII.- ACIDOS DIMEROS OXIDADOS: Cantidades excretadas, ingeridas y digestibilidades.

% ACEITE EN ACEITE EN DIETA DE OLIVA	EXCRETADO						INGERIDO	
	6		12		20		\bar{x}	$tS_{\bar{x}}$
	\bar{x}	$tS_{\bar{x}}$	\bar{x}	$tS_{\bar{x}}$	\bar{x}	$tS_{\bar{x}}$	\bar{x}	$tS_{\bar{x}}$
(1) NO CALENTADO	-		-		-		-	
(2) MEZCLA 50% de (1) y (3)	2,85	0,85 (38,3)*	2,33	1,17 (49,6)	3,02	1,01 (34,6)	4,62	0,16
(3) TERMOXIDADO 150 horas	5,94	0,83 (27,6)	5,47	0,67 (33,3)	6,34	0,82 (22,7)	8,20	0,20

* Digestibilidad

2.2.3.3.7.- Ácidos polímeros oxidativos y térmicos

La Tabla XXVIII recoge las cantidades medias y sus límites de confianza, de los ácidos polímeros no absorbidos por cada 100g de grasa ingerida, así como los valores de digestibilidad.

A la vista de los resultados obtenidos, resulta particularmente sorprendente que los valores sean similares a los correspondientes a los ácidos dímeros oxidados, pues es difícilmente explicable que compuestos de tan elevado peso molecular y compleja estructura, puedan ser absorbidos en igual magnitud.

Las diferencias encontradas entre los 3 últimos grupos de compuestos - dímeros no polares, dímeros oxidados y polímeros - muestran la complejidad asociada al proceso de absorción. La teoría establece que, una vez emulsionada la grasa y liberados los ácidos grasos por la acción de los enzimas lipolíticos, éstos deben pasar de la fase oleosa a la fase acuosa, formando micelas mixtas con las sales biliares, que entrarán en contacto con la membrana intestinal (193-195). Por tanto, las posibilidades de absorción dependen fundamentalmente, en primer lugar, de la actividad de los enzimas lipolíticos, en segundo lugar, de la solubilidad de los productos de hidrólisis, determinada principalmente por la polaridad de la molécula y, finalmente, del paso a través de la membrana intestinal, relacionada esencialmente con el tamaño molecular. Aunque los resultados obtenidos para los dos tipos de dímeros podrían justificarse en función de su diferente polaridad, los valores de digestibilidad de los ácidos polímeros no tienen una explicación razonable, a no ser que existan modificaciones previas a la absorción que disminuyan su peso molecular. En relación con esta hipótesis, se ha realizado una experiencia adicional, utilizando ácido [1-¹⁴C]-linoleico oxidado, cuyo desarrollo y conclusiones se detallan en el apartado 2.3.3.

Tabla XXVIII.- ACIDOS POLIMEROS: Cantidades excretadas, ingeridas y digestibilidades.

% ACEITE EN ACEITE DE OLIVA	EXCRETADO						INGERIDO	
	6		12		20		\bar{x}	$tS_{\bar{x}}$
	\bar{x}	$tS_{\bar{x}}$	\bar{x}	$tS_{\bar{x}}$	\bar{x}	$tS_{\bar{x}}$	\bar{x}	$tS_{\bar{x}}$
(1) NO CALENTADO	—		—		—		—	
(2) MEZCLA 50% de (1) y (3)	4,93	1,01	5,62	1,81	6,03	1,33	7,41	0,16
	(33,5)*		(24,2)		(18,6)			
(3) TERMOXIDADO 150 horas	8,72	1,37	9,52	0,76	9,83	1,37	13,82	0,60
	(36,9)		(31,3)		(28,9)			

** Digestibilidad

En resumen, los resultados obtenidos en la cuantificación de los compuestos no absorbidos presentes en las grasas termoxidadas, permiten deducir las siguientes conclusiones generales:

- 1º) La digestibilidad de la grasa disminuye con el incremento de la alteración, aunque no existen diferencias significativas debidas al nivel de grasa en la dieta.
- 2º) Las tasas más elevadas de absorción corresponden a los ácidos grasos no alterados, que en las dietas conteniendo aceites no calentados, se aproximan al 100%.
- 3º) Las mayores tasas de absorción, entre los compuestos de alteración, corresponden a los ácidos monómeros oxidados, mientras que los menores valores se obtienen para los ácidos dímeros de baja polaridad, originados como consecuencia de la elevada temperatura.
- 4º) La existencia de alteración termoxidativa origina modificaciones significativas en las tasas de absorción de los ácidos grasos no alterados y valores de digestibilidad negativos para la fracción insaponificable.
- 5º) A pesar de su elevado peso molecular, las tasas de absorción de los ácidos dímeros oxidados y polímeros son significativamente distintas de 0.

2.3.- ESTUDIOS ESPECIFICOS

En la evaluación de las tasas de digestibilidad de los grupos de compuestos originados en la termoxidación de las grasas, se obtienen algunos resultados que llaman especialmente la atención en relación con los que serían de esperar, teniendo en cuenta los conocimientos actuales sobre el proceso de digestión y absorción de grasas termoxidadas.

- 1) En los estudios realizados previamente, no se han encontrado precedentes de valores de digestibilidad neta negativos, como los obtenidos en este estudio para la fracción insaponificable.
- 2) La disminución de la digestibilidad de la grasa, como consecuencia del proceso termoxidativo, se ha atribuido a la dificultad de absorción de los compuestos de polimerización. La cuantificación realizada en este estudio no deja lugar a dudas de que a tal disminución contribuyen también los ácidos grasos no alterados.
- 3) Aunque la digestibilidad de las moléculas poliméricas de ácidos grasos es baja, lógica consecuencia de la selectividad de la

membrana, estos resultados están en contradicción con los obtenidos para los ácidos dímeros no polares, de menor peso molecular.

En este capítulo se realizan estudios específicos para profundizar en la significación de los resultados obtenidos en los 3 casos citados, contrastándose las hipótesis que, en nuestra opinión, justifican las tasas de absorción encontradas.

a) La existencia de interacción entre los lípidos de la dieta y los lípidos de origen interno.

b) La dificultad de actuación de la lipasa pancreática frente a moléculas de triglicéridos complejas.

c) Las posibilidades de modificación de los ácidos polímeros antes de la absorción propiamente dicha.

**2.3.1.- Interacción entre la grasa de la
dieta y los lípidos de origen
endógeno**

Los valores negativos de digestibilidad corregida encontrados para la fracción insaponificable en los grupos de animales alimentados con aceites alterados, demuestran claramente dos hechos:

- 1º) Las cantidades de insaponificable de origen endógeno, presentes en los lípidos no absorbidos, son superiores a las que se obtienen cuando los animales se alimentan con una dieta exenta de grasa.
- 2º) La alteración de la grasa contribuye significativamente a aumentar la cantidad de insaponificable de origen endógeno.

Aunque ambos hechos son suficientemente indicativos de una relación entre los lípidos endógenos y la composición de la dieta, en este apartado se analiza más profundamente este aspecto, a través de la cuantificación de 2 grupos de compuestos de interés, cuya ausencia en la dieta garantiza que su presencia está exclusivamente relacionada con los lípidos de origen interno:

a) Los esteroides neutros fecales de mayor interés fisiológico: colesterol y coprostanol.

b) Los ácidos no alterados de origen exclusivamente interno. La determinación de este grupo de compuestos, de importancia cuantitativa dentro de los lípidos endógenos, puede ser útil para

establecer si las correcciones realizadas en otros grupos de compuestos de alteración adolecen de un error similar al detectado en el caso de la fracción insaponificable.

La cuantificación de ambos grupos de compuestos permitirá, por otra parte, conocer si la modificación encontrada en los lípidos de origen interno afecta a las dos principales vías de producción de los mismos, ya que mientras los esteroides proceden de las secreciones biliar e intestinal, necesarias para que tenga lugar la digestión (196) (197), los ácidos endógenos se originan como consecuencia del metabolismo de los microorganismos de la flora intestinal (198).

2.3.1.1.- CUANTIFICACION DE ESTEROLES DE ORIGEN ENDOGENO

Muestras utilizadas

La determinación cuantitativa se ha realizado sobre 2 muestras de lípidos no absorbidos, de cada uno de los grupos de animales alimentados con las siguientes dietas:

- * Dieta alipídica
- * Dieta conteniendo 12% de aceite de oliva no calentado
- * Dieta conteniendo 12% de aceite de oliva de alteración media (mezcla al 50% de no calentado y termoxidado)
- * Dieta conteniendo 12% de aceite de oliva termoxidado

No se ha considerado necesario incluir muestras de todos los grupos puesto que los esteroides son los compuestos mayoritarios dentro de la fracción insaponificable y, en esta fracción, la principal influencia de la dieta sobre los lípidos endógenos está relacionada con el grado de alteración.

Procedimiento analítico

La determinación cuantitativa se lleva a cabo utilizando estigmasterol como patrón interno, previa comprobación de su ausencia en las muestras.

A partir de una solución que contiene 20 mg/ml de estigmasterol, se añade inicialmente a la muestra de grasa el volumen necesario para obtener una respuesta adecuada, teniendo en cuenta el porcentaje de insaponificable, previamente obtenido. El insaponificable, cuya extracción se realiza según el método descrito en el epígrafe 2.2.1.2. del esquema general, se disuelve en un volumen de cloroformo suficiente para depositar aproximadamente 5-10 mg de muestra en una placa cromato-

gráfica de 20x20 cm, preparada con gel de sílice G, con un espesor de 0,25 mm. Se depositan como referencia colesterol y coprostanol (~ 35 µg en unas 10 veces su peso en cloroformo) en los extremos laterales de la placa. Se introduce la placa en la cubeta con mezcla hexano-éter etílico 70:30 como líquido de desarrollo. La placa se saca de la cubeta cuando el frente líquido se haya situado a una distancia de 0,5 a 1 cm del límite superior. Por medio de los patrones de referencia se localiza la posición de las dos bandas de interés:

- 1.- Banda correspondiente al colesterol, que incluye, así mismo, estigmasterol, β -sitosterol y sus derivados 5 α -saturados.
- 2.- Banda correspondiente al coprostanol y los derivados 5 β -saturados de esteroides de plantas.

Con ayuda de una espátula se recoge la sílice que contiene cada banda de interés en un papel satinado, y se eluye en una columna, utilizando 10 ml de cloroformo. Tras la eliminación del disolvente en rotavapor, el residuo sólido se disuelve en 300 y 100 µl, para las bandas del colesterol y coprostanol, respectivamente, y se inyecta en el cromatógrafo gas-líquido.

Análisis cromatográfico

Las condiciones cromatográficas utilizadas han sido las siguientes:

- * Columna: OV-17 al 3% sobre Chromosorb 80-100 mallas
- * Flujo de nitrógeno: 30 ml/min
- * Temperatura del horno: 270°C
- * Temperatura del detector: 300°C
- * Temperatura del inyector: 300°C

— RESULTADOS Y DISCUSION —

La Figura 23 muestra 2 cromatogramas representativos de los esteroides de origen endógeno y de los obtenidos cuando existe grasa en la dieta, donde se observa la simplicidad de la composición de la fracción. En ambos casos, los registros corresponden a la banda que contiene el colesterol.

La separación e identificación mediante CGL-EM indica que los componentes mayoritarios de origen endógeno son el colesterol y el Δ^7 -colestenol. En los lípidos no absorbidos procedentes de animales alimentados con las dietas que contienen grasa, aparece también el β -sitosterol, que se encuentra en los esteroides del aceite de oliva en un porcentaje superior al 90%. Dada la importancia cuantitativa de los esteroides de origen endógeno en las muestras, no se aprecia la presencia del resto de los esteroides de la dieta. La Figura 24 muestra los espectros de los compuestos identificados, cuya estructura ha sido asignada teniendo en cuenta la identidad de los tiempos de retención cromatográficos y la similitud con los espectros de los respectivos patrones.

Las Figuras 25 y 26 muestran, de forma análoga, 2 cromatogramas obtenidos para la banda que contiene el coprostanol, y los espectros de masa de los componentes mayoritarios, respectivamente. Como puede observarse, éstos son el coprostanol y el β -sitostanol, lo que demuestra que la hidrogenación producida por los microorganismos afecta igualmente a los esteroides insaturados de la dieta (199) (200).

La Tabla XXIX resume los resultados obtenidos, expresados en mg/100 g de grasa ingerida, para las muestras de los 4 grupos de lípidos. La cantidad se ha calculado teniendo en cuenta que el consumo de 100 g de grasa corresponde en el resto de los grupos a un tiempo medio de 34,5 días. Puede observarse el incremento de los esteroides endógenos cuando existe grasa en la dieta y su dependencia, además, del nivel de alteración. Los mayores incrementos corresponden

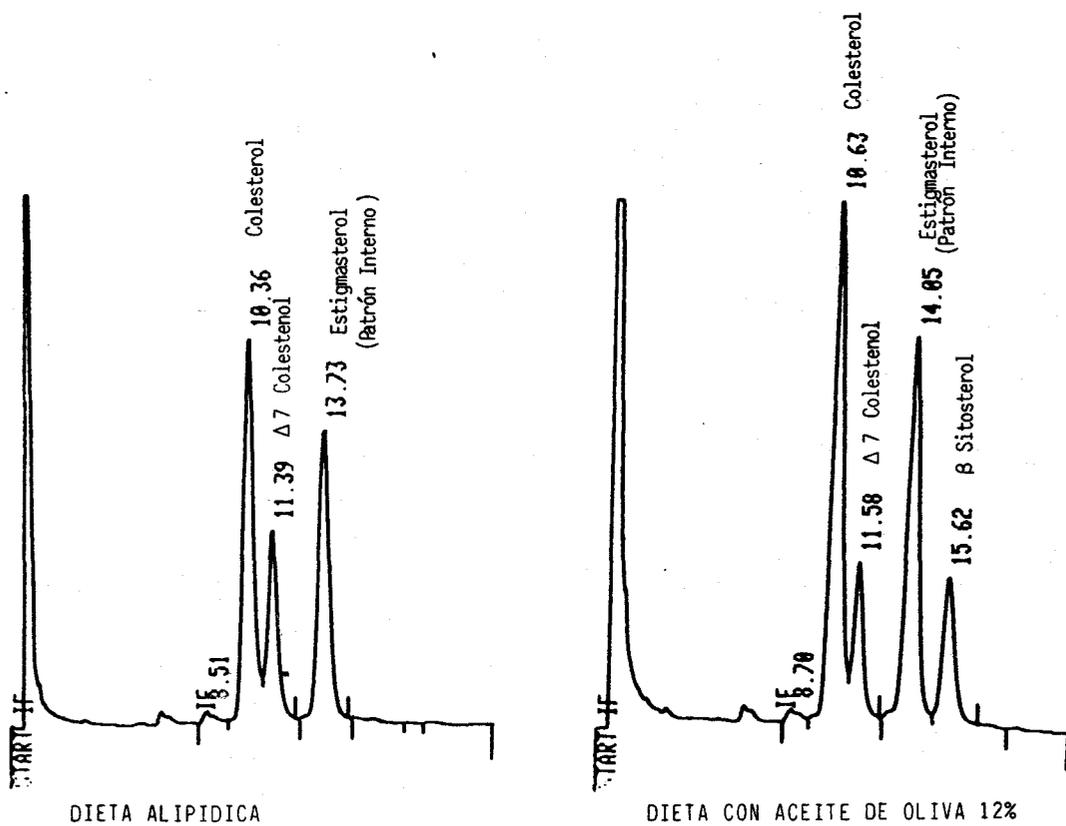


Figura 23.- Cromatogramas representativos de esteroides (Banda del colesterol) de lípidos no absorbidos

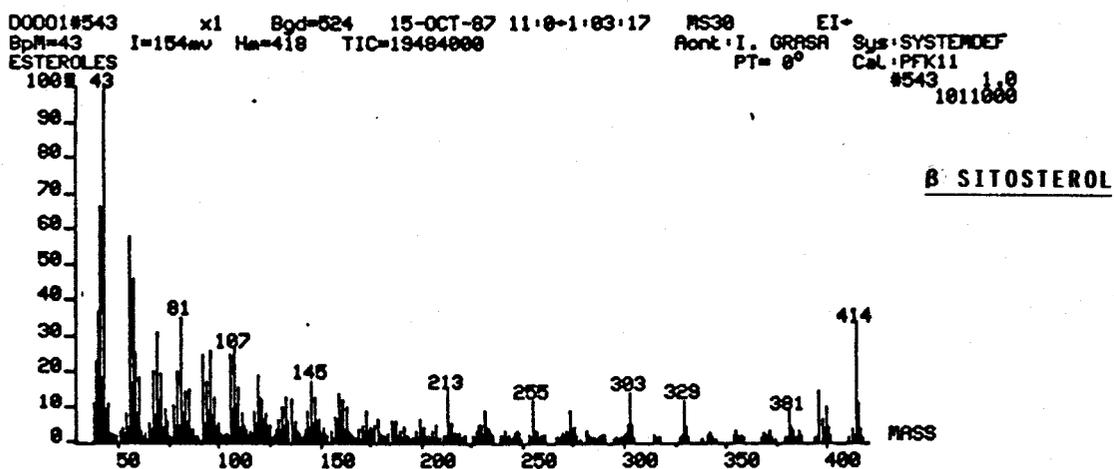
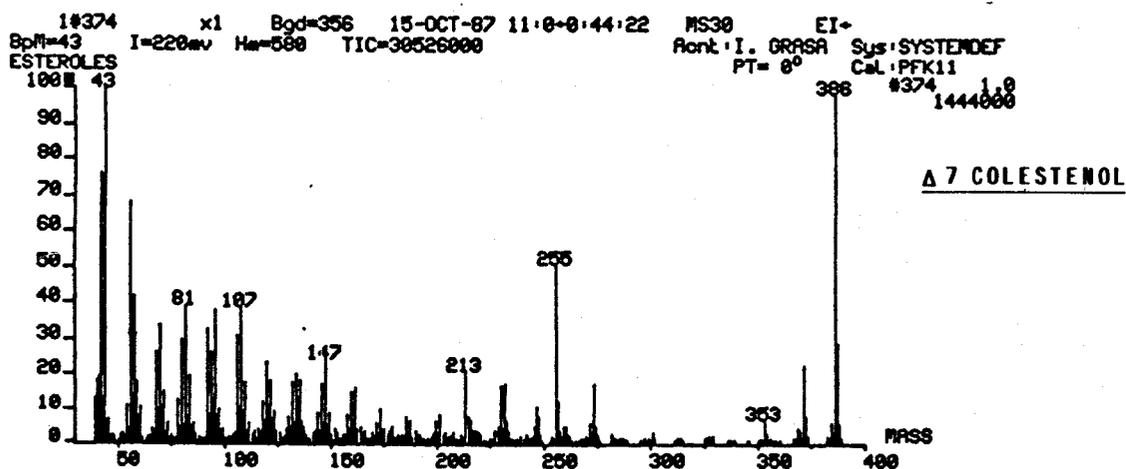
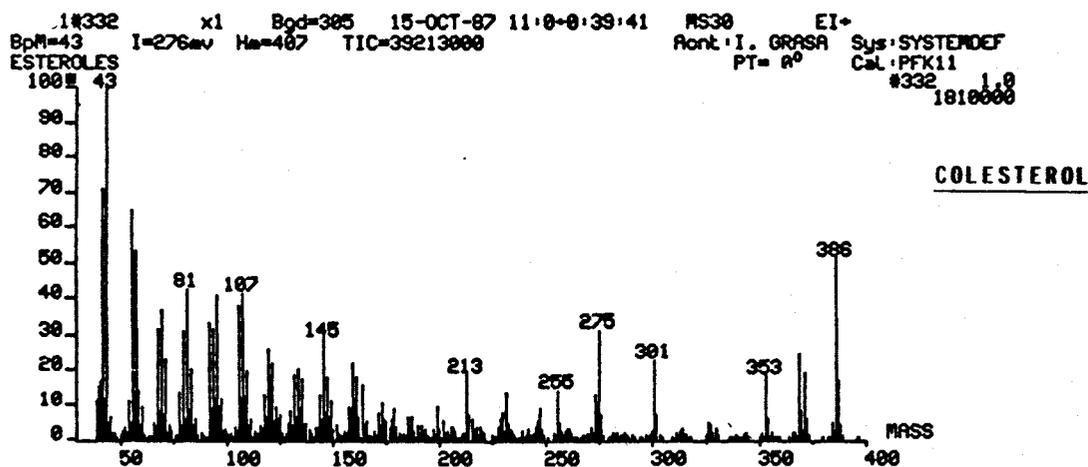


Figura 24.- Espectros de masa correspondientes a esteroides presentes en la banda del colesterol

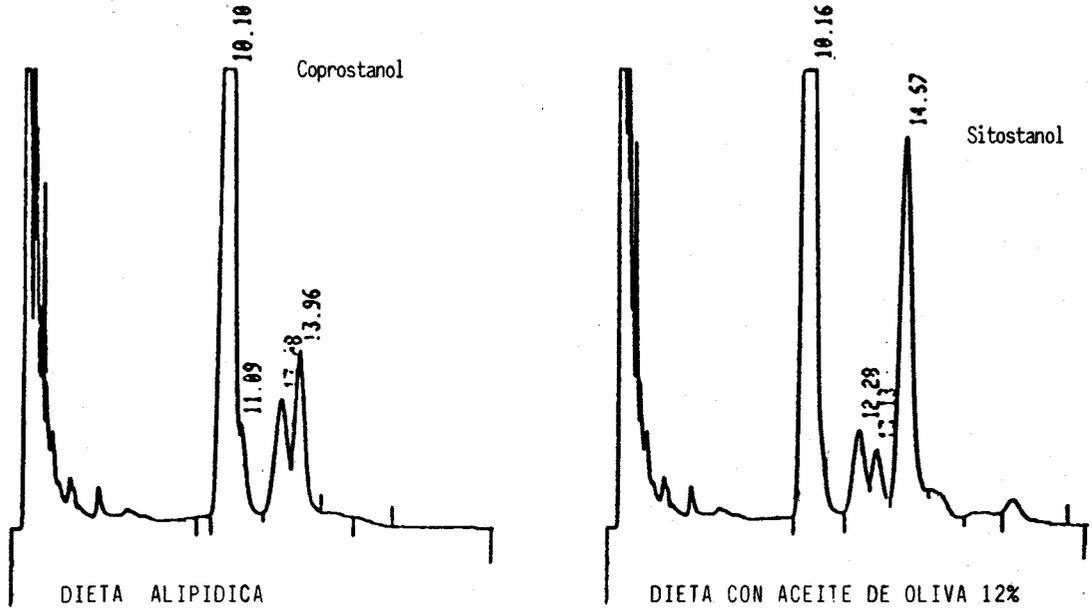


Figura 25.- Cromatogramas representativos de esteroides (Banda del coprostanol) de lípidos no absorbidos

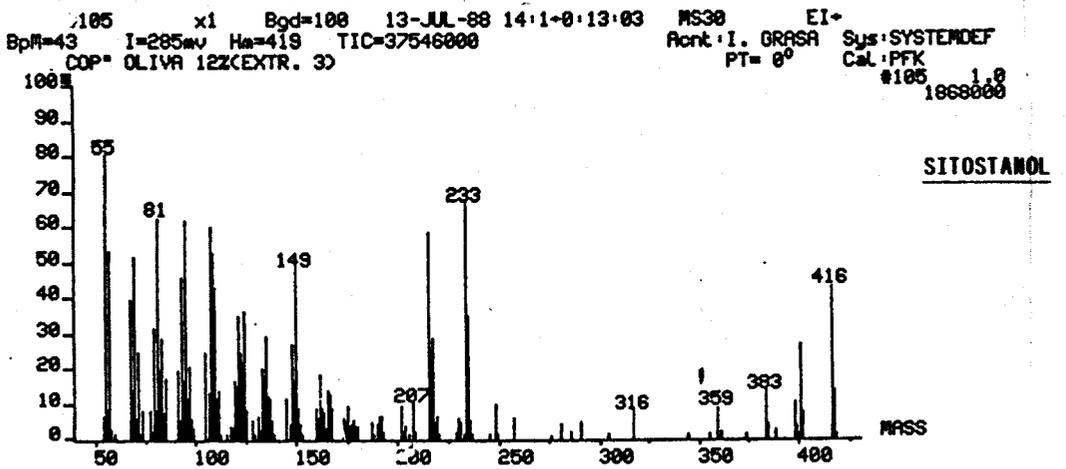
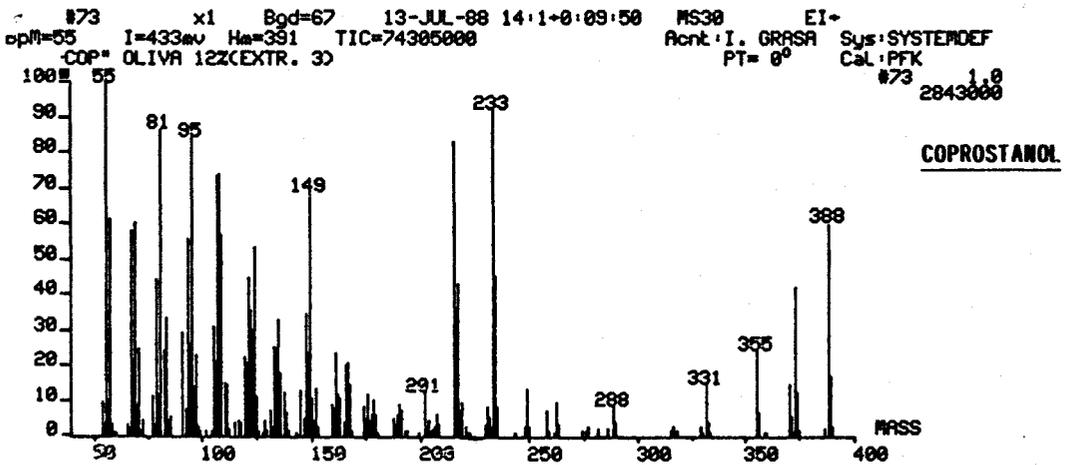


Figura 26.- Espectros de masa correspondientes a esteroides presentes en la banda del coprostanol

Tabla XXIX.- Determinación cuantitativa de esteroides de origen interno y de la dieta (mg/ 100 g de grasa ingerida).

	Lípidos endógenos	(1) Aceite no calentado	(2) Aceite mezcla 50% de (1) y (3)	(3) Aceite termooxidado 150 horas
BANDA COLESTEROL	158,8	263,2	340,2	480,0
- Colesterol	105,9	175,6	216,7	339,0
- Sitosterol	-	44,9	66,7	58,3
BANDA COPROSTANOL	69,7	70,9	43,9	24,3
+ Coprostanol	54,1	43,7	23,1	16,8
- Sitostanol	-	19,8	7,8	2,2
ESTEROLES TOTALES	228,5	269,4	384,1	504,3
ESTEROLES DE LA DIETA	-	64,7	74,5	60,5
ESTEROLES DE ORIGEN ENDOGENO	228,5	269,4	309,6	443,8
<u>Sitosterol en aceite:</u>	-	101,2	86,8	69,6

a la cantidad de colesterol, que llega a ser 3 veces superior cuando la dieta contiene el aceite calentado 150 horas. Resulta significativo que el incremento de colesterol vaya paralelo a la disminución de su derivado hidrogenado, de forma similar a lo que ocurre en el caso del β -sitosterol, lo que indicaría la existencia, en mayor cantidad, de otros sustratos con posibilidad de ser igualmente reducidos.

El incremento notable de esteroides con la alteración se podría explicar por similitud con los resultados obtenidos cuando existe una deficiente asimilación de la grasa. Se ha comprobado que la disminución en la hidrólisis enzimática o la limitación en la cantidad de sales biliares secretadas, dificulta el paso del colesterol a la fase micelar ya que su solubilidad es muy superior en la fase oleosa no absorbida (201) (202).

En el apartado siguiente se estudia la acción de la lipasa pancreática sobre moléculas de triglicéridos complejas, que demuestra la existencia de grasa no hidrolizada en cantidades importantes.

2.3.1.2.- CUANTIFICACION DE ACIDOS NO POLARES DE ORIGEN ENDOGENO

La obtención de valores negativos de digestibilidad para cualquier compuesto , implica la existencia de una cantidad excretada superior a la ingerida y, por ello, sólo es posible encontrar valores negativos en el caso de compuestos presentes en la fracción endógena y que, además, se encuentren en cantidades muy pequeñas en la dieta o tengan tasas de absorción muy cercanas a cero.

Entre los grupos de compuestos que han sufrido corrección por la existencia de los lípidos endógenos, sólo la fracción insaponificable se encuentra en la grasa en estas circunstancias. Ello no implica que una situación similar de interacción con los lípidos internos no pueda tener lugar, aunque difícilmente observable, cuando los valores de digestibilidad sean superiores a cero.

En este sentido, la cuantificación de los ácidos endógenos constituye otro camino posible de análisis de la influencia de la dieta sobre los lípidos de origen interno, que permite obtener conclusiones sobre un grupo de compuestos de la fracción saponificable - los ácidos grasos no alterados - con valores muy elevados de digestibilidad.

Muestras utilizadas

La cuantificación se aplica a todas las muestras de lípidos no absorbidos, incluidas las procedentes de animales alimentados con la dieta alipídica, exenta de grasa.

Procedimiento analítico

La determinación de la composición de ácidos grasos se realiza según el método expuesto en el apartado 2.2.1.2.

— RESULTADOS Y DISCUSION —

Teniendo en cuenta la composición en ácidos grasos de los aceites de oliva utilizados en las dietas, que se recoge en la Tabla IV, los ácidos presentes en los lípidos no absorbidos se han dividido en 2 grupos bien definidos:

- a) Ácidos presentes en la grasa de la dieta
- b) Ácidos no presentes en la grasa de la dieta

Puesto que las cantidades totales de ácidos no polares han sido cuantificados previamente (Tabla XXIII), a partir de los porcentajes obtenidos para ambos grupos de ácidos, es posible calcular fácilmente las cantidades reales excretadas de ácidos endógenos no presentes en la dieta. Igualmente, a partir del porcentaje obtenido para el grupo alimentado sin grasa, se calculan de forma sencilla las cantidades utilizadas para la corrección en los distintos grupos.

Todos estos resultados se muestran en la Tabla XXX, que recoge los valores medios para cada grupo. De ella se deduce una situación muy similar a la encontrada en el caso de la fracción insaponificable, que se resume en dos hechos:

- 1) En todos los casos las cantidades de ácidos endógenos excretados son superiores a las obtenidas cuando los animales se alimentan con la dieta exenta de grasa.
- 2) Las cantidades excretadas están directamente relacionadas con el nivel de alteración de la grasa de la dieta.

Los resultados obtenidos en este caso, parecen indicar la existencia de modificaciones en la población bacteriana debido al incremento de grasa en las heces, tal como ocurre en pacientes con esteatorrea (203) o en el caso de otros sustratos de difícil digestión (204), y, por tanto, deberían esperarse resultados similares en el caso de los ácidos monómeros oxidados.

Tabla XXX.- Determinación cuantitativa de ácidos de origen endógeno no presentes en la grasa de la dieta.

			ACIDOS DE ORIGEN ENDOGENO			
			PRESENTES EN LA DIETA (%) (C ₁₆ + C ₁₈)	NO PRESENTES EN LA DIETA (%)	NO PRESENTES EN LA DIETA (g/100g grasa ingerida)	(g/100g grasa ingerida)*
LIPIDOS ENDOGENOS :			33,5	66,5		
GRASA EN DIETA (%)	6	(1) No calentado	68,0	32,0	0,36	0,30
		(2) Mezcla 50% de (1) y (3)	73,5	26,5	0,93	0,31
		(3) Termoxidado	80,0	20,0	1,46	0,32
	12	(1) No calentado	74,3	24,7	0,41	0,17
		(2) Mezcla 50% de (1) y (3)	78,0	22,0	0,76	0,16
		(3) Termoxidado	88,0	12,0	0,86	0,16
	20	(1) No calentado	73,8	26,2	0,37	0,15
		(2) Mezcla 50% de (1) y (3)	80,6	19,4	0,79	0,13
		(3) Termoxidado	85,9	14,1	0,93	0,12

* Cantidades utilizadas para la corrección

En conclusión, los resultados demuestran que las correcciones realizadas, utilizando un grupo de animales alimentados con dieta exenta de grasa, son sólo aproximadas. No obstante, si en el caso del insaponificable la influencia es tan notable que impide la evaluación de la digestibilidad de la citada fracción, los incrementos de ácidos endógenos son cuantitativamente de muy poca importancia en relación con los absorbidos procedentes de la dieta, y puede deducirse que los valores obtenidos de digestibilidad estarían evaluados por defecto, en cantidades no superiores al 2% en el caso de las grasas más alteradas.

**2.3.2.- Diferenciación entre las etapas de
hidrólisis enzimática y absorción**

La primera etapa en la digestión lipídica consiste en un proceso de emulsión previa de la grasa, necesario para desintegrar los grandes glóbulos que forma, en glóbulos menores, de manera que los enzimas lipolíticos puedan actuar sobre la superficie de los mismos. Esto se consigue por influencia de las sales biliares, que disminuyen enormemente la tensión superficial de la grasa.

Tras la etapa fundamental de la digestión lipídica, constituida por la hidrólisis enzimática, las sales biliares tienden a formar micelas, actuando así como medio de transporte para llevar los monoglicéridos y ácidos grasos libres, ambos productos finales de la digestión lipídica, hacia los bordes ciliados de las células epiteliales. Finalmente, al entrar en contacto con estas superficies tiene lugar la fase de absorción por difusión de ácidos grasos y monoglicéridos a través de la membrana intestinal.

Dificultades en la fase de hidrólisis previa determinan, lógicamente, deficiencias en la absorción de la grasa, que podrían justificar las bajas tasas de absorción encontradas para algunos grupos de compuestos. Para profundizar en este aspecto, se han diseñado experiencias específicas destinadas a diferenciar las fases de hidrólisis enzimática y absorción, por una doble vía:

- a) El estudio "in vitro" de la acción de la lipasa pancreática sobre moléculas complejas de triglicéridos.

- b) La determinación, en los lípidos de heces de los animales experimentales, de las proporciones relativas en que los ácidos se encuentran libres y esterificados.

2.3.2.1.- HIDROLISIS ENZIMATICA "IN VITRO" DE GRASAS TERMOXIDADAS

Como es bien conocido, la lipasa pancreática es el enzima procedente del jugo pancreático, que hidroliza específicamente los ésteres de alcoholes primarios y realiza un importante papel en el intestino delgado, llevando a cabo la hidrólisis selectiva de los triglicéridos en sus posiciones α . Su característica más sobresaliente es su afinidad por la interfase aceite-agua y de ahí la necesidad de que la grasa se encuentre en forma de emulsión.

La extensión de la hidrólisis enzimática depende tanto de la estructura del alcohol como de los ácidos grasos esterificados, de sus características estéricas e hidrofóbicas y de la presencia de grupos electrofílicos (205-211). Sin embargo, los estudios previos referentes a hidrólisis enzimática de grasa naturales alteradas son escasos y divergentes en sus conclusiones (125) (212).

El primer estudio realizado utiliza aceite de maíz fresco y térmicamente oxidado y en él se concluye que, aún cuando la velocidad inicial de hidrólisis sea menor para el aceite más alterado, el porcentaje de ácidos grasos obtenido al cabo de 24 horas, es prácticamente el mismo para ambos (125). Por el contrario, estudios posteriores realizados con fracciones concentradas en productos de alteración, muestran mayor variabilidad en los resultados, aunque no aportan una buena definición previa de las fracciones utilizadas (212).

Existen, sin embargo, ciertos inconvenientes en los estudios realizados, que cuestionan la validez de los resultados obtenidos:

1) La indefinición del grado de alteración de las muestras de partida, que impide obtener conclusiones sobre la acción del enzima, al desconocerse la complejidad de las moléculas sobre las que actúa.

2) La evaluación del grado de hidrólisis, que se determina mediante valoración volumétrica de los ácidos grasos liberados.

La necesidad de interrumpir la reacción enzimática utilizando ClH concentrado, cuyo exceso debe ser eliminado antes de la valoración de los ácidos grasos libres, tiene como consecuencia que cantidades insignificantes de ácido no eliminado, ocasionen errores por exceso en la determinación de los ácidos grasos y dificultades para obtener una buena reproducibilidad.

Las experiencias desarrolladas en este estudio soslayan ambos inconvenientes y proporcionan, en nuestra opinión, una nueva e interesante posibilidad de evaluación de la acción del enzima. En relación con la definición de la muestra, los métodos analíticos desarrollados en el apartado 2.1. permiten cuantificar los principales grupos de compuestos de alteración y conocer la distribución de pesos moleculares. La evaluación mediante cromatografía de exclusión de la muestra obtenida tras la acción del enzima permite, por tanto, no sólo evaluar los ácidos grasos libres sin interferencia del ClH presente, sino también otros compuestos que aparecen y desaparecen después de la hidrólisis enzimática.

PLANTEAMIENTO DE LA EXPERIENCIA

Muestras utilizadas

Para la evaluación de la actividad lipolítica se han utilizado las muestras de aceite incorporadas en las dietas de los animales experimentales, así como una fracción concentrada en productos de alteración:

- [1] - Aceite de oliva puro fresco
- [2] - Aceite de oliva puro termoxidado durante 150 horas a 180°C
- [3] - Mezcla de [1] y [2] al 50%
- [4] - Fracción de triglicéridos polares, obtenida mediante cromatografía en columna.

Las muestras son de polaridad creciente pues poseen, respectivamente; 4,5 ; 67,2 ; 37,1 y 100% de triglicéridos alterados.

Procedimiento analítico

A 100 mg de la muestra pesada en un tubo, se añaden 20 mg de polvo de lipasa, pesados con exactitud del mg, y 2 ml de disolución de tris-(hidroximetil)-aminometano 1M (pH=8). Se agita suavemente y se añaden 2 ml de disolución de cloruro cálcico al 22% y 0,5 ml de colato sódico al 0,1%. Después de un tiempo de reacción establecido, en que la muestra se agita en condiciones controladas, se añade 1 ml de ClH 6M para parar la reacción. La grasa se extrae cuantitativamente con porciones sucesivas de 2 ml de hexano-éter etílico 1:1. Los extractos reunidos se lavan con agua destilada para eliminar el ClH y se recogen en un matraz aforado de 5 ml.

La determinación cuantitativa de los compuestos constituyentes se realiza mediante cromatografía de exclusión, en condiciones similares a las establecidas previamente en el apartado 2.1.

En relación con los tiempos de reacción, las muestras de grasa [1], [2] y [3] se han sometido a hidrólisis durante 2 y 30 minutos, mientras que la muestra de triglicéridos polares [4] es hidrolizada durante 2, 5, 30, 60 y 120 minutos.

El tiempo mínimo de reacción se ha establecido en 2 minutos, realizando ensayos previos con la muestra que teóricamente debe hidrolizarse más fácilmente (aceite de oliva no calentado), hasta conseguir un porcentaje de ácidos grasos libres de aproximadamente un 50%. Este valor está aún alejado del 66% correspondiente a la hidrólisis de todos los ácidos en posición α y, permite, por tanto, obtener información sobre el distinto comportamiento de las muestras.

— RESULTADOS Y DISCUSION —

La Figura 27 muestra los cromatogramas correspondientes a todas las muestras hidrolizadas durante el mismo tiempo (2 min). En ella se observa claramente el elevado grado de hidrólisis obtenido para la muestra de oliva puro no calentado y la disminución en la cantidad de ácidos grasos y monoglicéridos, obtenida conforme aumenta la alteración de la muestra. Los resultados son directamente comparables, puesto que todos los cromatogramas corresponden a cantidades muy similares de muestra inyectada. El hecho más llamativo, en nuestra opinión, se encuentra en la inversión producida, después de la lipólisis, en las moléculas de dímeros, trímeros y polímeros, que demuestra claramente la mayor dificultad de hidrólisis cuando aumenta el peso molecular del glicérido.

Los resultados cuantitativos obtenidos se recogen en la Tabla XXXI, donde se muestran, igualmente, las modificaciones obtenidas después de 30 min de hidrólisis. En este último caso, no ha sido posible cuantificar los dímeros de triglicéridos, que han desaparecido casi por completo, mientras que sólo se obtiene un pico no definido que engloba los compuestos de peso molecular superior.

A partir de los resultados se deducen claramente las siguientes conclusiones:

- 1º) Se observa que el porcentaje de hidrólisis disminuye a medida que aumenta la alteración de las muestras, y se comprueba además que la hidrólisis es tanto menor cuanto mayor es el peso molecular del triglicérido.
- 2º) Los resultados obtenidos para las muestras de alteración intermedia, muestras [2] y [3], son prácticamente coincidentes con los valores medios teóricos correspondientes a las mezclas obtenidas a partir de las muestras extremas, como se indica para el porcentaje de ácidos grasos monómeros en la Tabla XXXII.

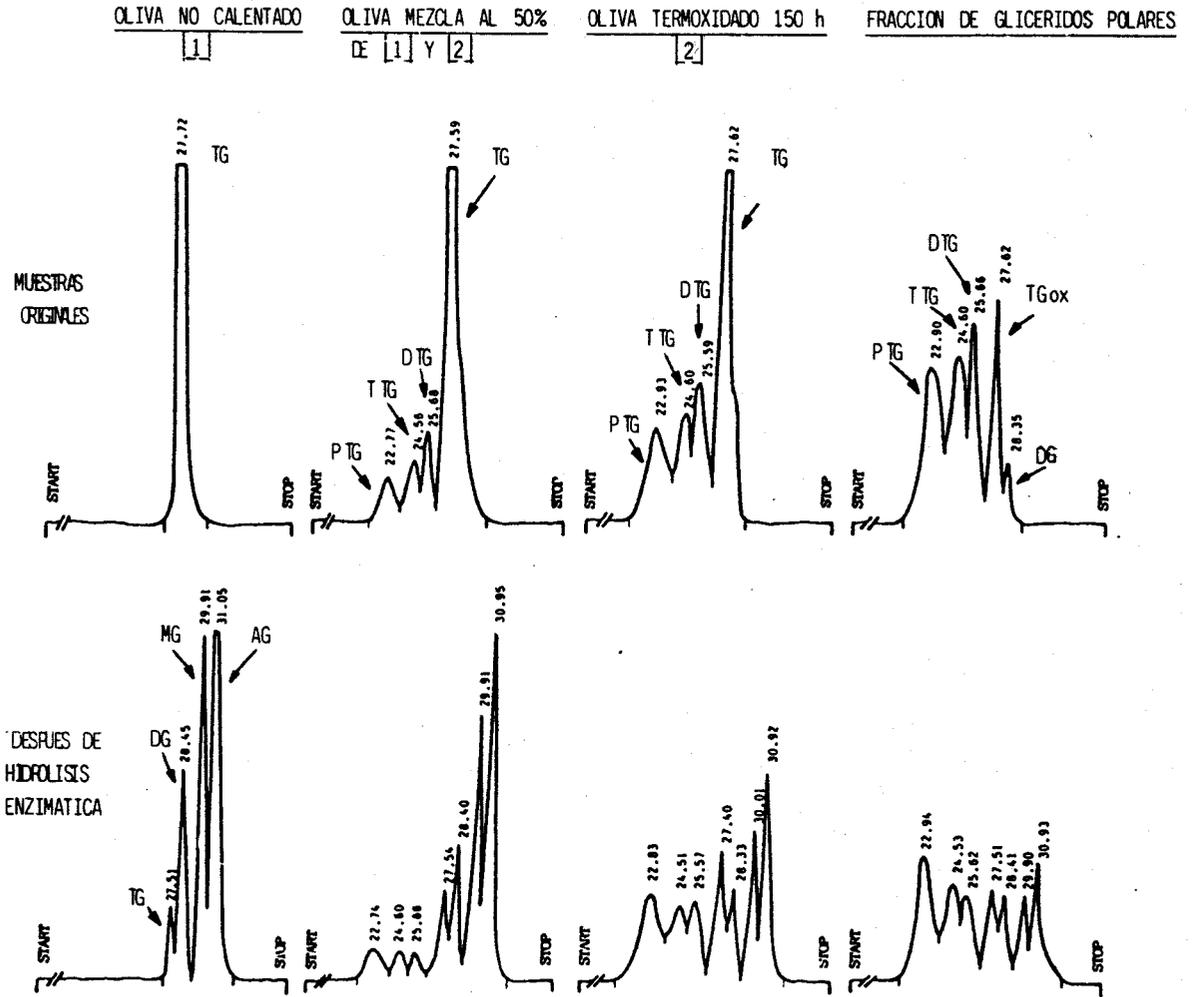


Figura 27.- Hidrólisis enzimática "in vitro" de los aceites utilizados en las dietas y de la fracción polar.

Tabla XXXI.- Determinación cuantitativa de los distintos grupos de compuestos en las muestras iniciales y después de ser sometidas a hidrólisis durante 2 y 30 min.

MUESTRAS	HIDROLISIS (tiempo de reacción)	Polímeros de TG **	Trímeros de TG	Dímeros de TG	Monómeros de TG + Polímeros de AG	DG + Dímeros de AG	MG	AG
[1]*	0 min				100			
[2]		10,3	10,1	8,2	70,3			
[3]		20,2	19,4	15,0	45,4			
[4]		28,5	24,8	21,1	17,6	8,0		
[1]	2 min				7,2	18,1	28,3	46,4
[2]		9,8	7,2	5,0	8,4	12,2	22,0	35,4
[3]		19,3	14,8	10,5	12,6	9,2	13,9	19,7
[4]		28,8	17,9	16,5	11,4	8,4	7,6	9,4
[1]	30 min					1,3	27,2	71,5
[2]			10,9	n.c.***	8,3	6,3	16,0	58,5
[3]			27,5	n.c.	7,7	8,6	12,6	43,6
[4]			43,0	n.c.	8,5	9,5	10,7	28,3

- * [1]: Aceite de oliva puro no calentado
 [2]: Aceite mezcla de [1] y [3] al 50%
 [3]: Aceite de oliva puro termoxidado durante 150 horas a 180°C
 [4]: Fracción de compuestos polares

**TG : Triglicéridos
 DG : Diglicéridos
 MG : Monoglicéridos
 AG : Acidos grasos

*** n.c.: no cuantificable

Tabla XXXII.- Porcentajes de ácidos monómeros (reales y teóricos) en las muestras sometidas a hidrólisis durante 2 y 30 min.

Muestras	TG no alterados (%)	TG alterados (%)	ACIDOS MONOMEROS			
			2 min (REAL)	2 min (TEORICO)	30 min (REAL)	30 min (TEORICO)
[1]**	95,5	4,5	46,4	46,4	71,5	71,5
[2]	62,7	37,1	35,4	32,6*	58,5	55,3*
[3]	31,5	67,2	19,7	20,9*	43,6	41,5*
[4]	0	100	9,4	9,4	28,3	28,3

$$\text{ACIDOS MONOMEROS (valor teórico) (\%)} = \frac{(\text{TG no alterados (\%)} \times \text{ACIDOS MONOMEROS en [1] (\%)} + (\text{TG alterados (\%)} \times \text{ACIDOS MONOMEROS en [4] (\%)}))}{100}$$

**Para claves ver Tabla XXXI

3º) El porcentaje de hidrólisis aumenta considerablemente con el tiempo de reacción. En el caso del aceite no calentado es, incluso, superior al 66% teórico. Los porcentajes de ácidos grasos mayoritarios obtenidos tras la separación mediante cromatografía en capa fina y posterior metilación muestran la disminución de ácido palmítico a los 30 min, lo que indica claramente la contribución extra de los ácidos presentes en posición 2 y , por tanto, la existencia de isomerización.

La mayor dificultad de hidrólisis de los triglicéridos alterados, por otra parte, se muestra en la Tabla XXXIII, donde se recogen los resultados obtenidos para la hidrólisis de la muestra [4] a diferentes tiempos de reacción. En ella se han agrupado los trimeros y polímeros de triglicéridos ya que, a partir de un tiempo de reacción de 5 min, se encuentran como un único pico. Los resultados indican claramente que, a partir de 15 min, la hidrólisis es muy lenta, tanto por lo que se refiere a la disminución de los polímeros de triglicéridos, como a la aparición de los ácidos grasos libres. Después de 2 horas de reacción, el porcentaje de hidrólisis se aleja sensiblemente de la composición en ácidos grasos obtenida tras la hidrólisis total de la muestra.

La Tabla XXXIV resume los resultados obtenidos tras definir 3 zonas de interés entre los compuestos cuantificados. En todas las muestras alteradas se han agrupado los triglicéridos de mayor peso molecular que los monómeros, ya que la cantidad existente después de la reacción indica la mínima cantidad no hidrolizada, puesto que ninguno de los ácidos grasos originados solapan en esa zona. Por otra parte, los monoglicéridos y ácidos grasos originados como consecuencia de la hidrólisis, proporcionan un valor mínimo de la cantidad de compuestos nuevos formados, ya que no se encuentran presentes en las muestras originales. La zona intermedia carece, sin embargo, de interés, puesto que constituye una mezcla, en cantidades variables, de compuestos no hidrolizados, parcialmente hidrolizados y polímeros de ácidos grasos.

Tabla XXXIII.- Influencia del tiempo de reacción en la hidrólisis enzimática "in vitro" de los compuestos polares.

HIDROLISIS (tiempo de reacción)	Polímeros de TG	Trímeros de TG	Dímeros de TG	Monómeros de TG + Polímeros de AG	DG + Dímeros de AG	MG	AG
0 min	53,3	21,1	17,7	8,0			
3 min	46,7	16,5	11,4	8,4	7,6	9,4	
5 min	49,0	n.c.	10,8	8,0	13,0	19,2	
15 min	43,7	n.c.	9,3	9,1	12,8	25,1	
30 min	43,0	n.c.	8,5	9,5	10,7	28,3	
60 min	40,6	n.c.	8,7	10,4	10,2	30,1	
120 min	39,8	n.c.	8,2	11,2	10,0	30,8	

n.c.: no cuantificable

Tabla XXXIV.- Cuantificación del porcentaje de hidrólisis mínimo y máximo a diferentes tiempos de reacción.

MUESTRAS	HIDROLISIS (tiempo de reacción)	Compuestos no hidrolizados ($t_R < 27$ min)	Mezcla de compuestos hidrolizados y no hidrolizados ($27 \text{ min} < t_R < 29 \text{ min}$)	Compuestos de hidrólisis ($t_R > 29$ min)
[1]*	0 min	-	100	-
	2 min	-	25,3	74,7
	30 min	-	1,3	98,7
[2]	0 min	28,6	70,3	-
	2 min	22,0	20,6	57,4
	30 min	10,9	14,6	74,5
[3]	0 min	54,6	45,4	-
	2 min	44,6	21,8	33,6
	30 min	27,5	16,3	56,2
[4]	0 min	74,4	25,6	-
	2 min	63,2	19,8	17,0
	3 min	49,0	18,8	32,2
	15 min	43,7	18,4	37,9
	30 min	43,0	18,0	39,0
	60 min	40,6	19,1	40,3
	120 min	39,8	19,4	40,8

* Para claves ver Tabla XXXI

Los resultados muestran claramente, en el caso de las grasas alteradas, que a los 120 min queda más del 50% de moléculas poliméricas sin hidrolizar y que, además, la cantidad no hidrolizada disminuye muy lentamente desde un tiempo de reacción de 15 min.

En síntesis, los bajos valores de hidrólisis obtenidos para la fracción alterada son una evidencia de la dificultad existente, en la etapa previa a la absorción, para la actuación de la lipasa pancreática sobre moléculas de triglicéridos complejas originadas por alteración termoxidativa. Por ello, es comprensible la disminución observada en la digestibilidad de los ácidos grasos no alterados que se encuentran, en parte, incluidos en moléculas de triglicéridos alterados. Estas moléculas podrían ser sólo parcialmente hidrolizadas y, en consecuencia, no absorbidas.

2.3.2.2.- DETERMINACION DE ACIDOS LIBRES Y ESTERIFICADOS EN LIPIDOS NO ABSORBIDOS

Una vez analizadas las posibilidades de hidrólisis enzimática "in vitro", el planteamiento de este nuevo apartado está dirigido a diferenciar las dos etapas previas a la asimilación de la grasa - hidrólisis enzimática y absorción - en condiciones reales, lo que nos permitirá definir la contribución relativa de cada etapa en la disminución de digestibilidad observada en los ácidos grasos no alterados, conforme aumenta el grado de alteración de la grasa ingerida. Por otra parte, el estudio puede permitir establecer comparaciones entre la hidrólisis enzimática "in vitro" e "in vivo", tema sobre el cual no se han encontrado antecedentes.

Las muestras y los métodos analíticos disponibles permiten desarrollar este apartado siguiendo tres vías independientes y, a la vez, complementarias:

- a) El análisis directo mediante cromatografía de exclusión de las muestras de lípidos de heces.
 - b) La relación existente entre los ácidos totales y la acidez libre de las muestras.
 - c) La cuantificación directa de ácidos grasos no alterados y ácidos dímeros no polares, libres y esterificados.
- a) Análisis directo mediante cromatografía de exclusión de las muestras de lípidos no absorbidos**

Una interesante posibilidad para obtener una apreciación aproximada y objetiva del grado de hidrólisis enzimática que han experimentado las grasas "in vivo", consiste en analizar mediante

cromatografía de exclusión, las muestras de lípidos no absorbidos obtenidas por extracción directa en Söxhlet.

Como se ha comentado en el apartado precedente, la presencia de compuestos con tiempos de retención inferiores a los triglicéridos monómeros, indica la existencia de lípidos semihidrolizados o no hidrolizados, ya que los ácidos polímeros presentes en la muestra eluyen a tiempos de retención superiores.

Los registros cromatográficos obtenidos para todas las muestras permiten deducir interesantes conclusiones cualitativas, como puede observarse en la Figura 28, donde se muestran 2 cromatogramas representativos de la situación general encontrada, en el caso de grasa alterada (A) y no alterada (B).

Se han seleccionado para la figura, dos muestras correspondientes a los grupos de animales alimentados con el 20% de grasa, no calentada y termoxidada durante 150 horas. A la izquierda se encuentran los registros correspondientes a la evaluación directa de los lípidos (A) y a la derecha los obtenidos tras la hidrólisis ácida de las mismas muestras (B). Como puede observarse, la hidrólisis origina una modificación sustancial en la distribución de pesos moleculares en la muestra, cuando la dieta contenía grasa termoxidada, mientras que no existen cambios apreciables en el caso de la grasa no calentada. La superposición de los cromatogramas A y B define una zona, correspondiente a los compuestos semihidrolizados y no hidrolizados, cuya proporción es del orden del 35% de los lípidos no absorbidos obtenidos por extracción directa. Este valor mínimo de grasa no hidrolizada corresponde al 15% de los triglicéridos polares ingeridos y, más específicamente, al 30%, aproximadamente, de los polímeros de triglicéridos.

De la comparación de estos resultados con los obtenidos "in vitro", sometiendo los triglicéridos polares a la acción de la lipasa pancreática durante periodos de tiempo prolongados (Tabla XXXIII), se deduce que la acción enzimática encontrada "in vivo" es más drástica

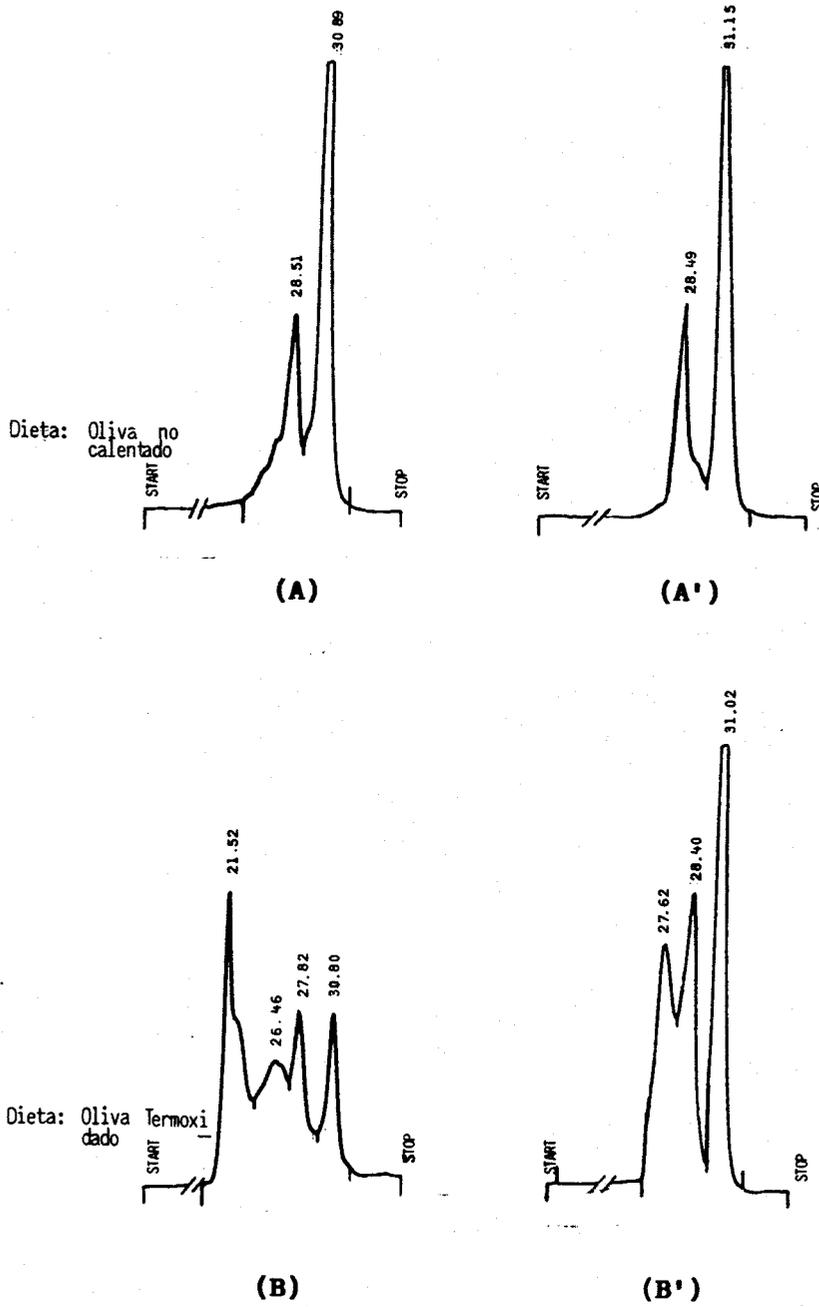


Figura 28.- Cromatogramas representativos de lípidos no absorbidos (A y B) y los correspondientes tras hidrólisis ácida (A' y B').

ya que, en los ensayos "in vitro", después de 2 horas, permanece sin hidrolizar el 53,4% de los polímeros de triglicéridos. Es evidente, sin embargo, que las diferencias serían menores con un mayor tiempo de reacción o con una mayor relación de concentraciones entre enzima y sutrato.

En conclusión, el análisis de la distribución de pesos moleculares de los lípidos no absorbidos demuestra la dificultad de hidrólisis de los compuestos glicerídicos de mayor peso molecular y confirma los resultados obtenidos "in vitro".

b) Relación entre la fracción saponificable y los ácidos grasos libres presentes en las muestras de lípidos no absorbidos

Aunque en el análisis directo de los lípidos de heces, se ha comprobado la presencia de grasa no hidrolizada y la existencia de unos porcentajes superiores a los obtenidos "in vitro", es difícil cuantificar las cantidades totales de ácidos esterificados, puesto que la separación por exclusión no permite distinguir entre glicéridos parciales y ácidos grasos de similar peso molecular.

Es posible, sin embargo, realizar una cuantificación simple de las cantidades totales de ácidos presentes en la grasa y de las que se encuentran hidrolizadas, sin más que comparar las cantidades de fracción saponificable con las fracciones de ácidos libres, presentes en las muestras de lípidos no absorbidos.

La Tabla XXXV recoge las cantidades medias, para todos los grupos de animales, de ambas fracciones, expresadas en gramos obtenidos por cada 100 g de grasa ingeridos, y como porcentaje sobre el total de lípidos no absorbidos.

Tabla XXXV.- LIPIDOS NO ABSORBIDOS: Determinación cuantitativa de ácidos totales y libres.

% ACEITE EN ACEITE DIETA DE OLIVA	6		12		20	
	Acidos totales	Acidos libres	Acidos totales	Acidos libres	Acidos totales	Acidos libres
(1) NO CALENTADO	5,29* (76,1)**	5,19 (74,6)	3,97 (77,5)	3,25 (63,5)	3,21 (75,0)	2,70 (63,1)
(2) MEZCLA 50% de (1) y (3)	13,91 (86,2)	9,70 (60,1)	13,77 (91,4)	7,87 (52,2)	14,72 (86,7)	7,64 (45,0)
(3) TERMOXIDADO 150 horas	27,63 (91,4)	17,84 (59,0)	28,62 (94,7)	15,54 (51,4)	29,16 (95,8)	12,72 (41,8)

* g/100 g de grasa ingerida

** g/100 g de lípidos no absorbidos

Las cantidades de materia saponificable se obtienen por diferencia entre la grasa total y la fracción insaponificable, y representan el total de los ácidos no absorbidos que se encuentran tanto en forma libre como esterificados.

Las cantidades de ácidos grasos libres se obtienen a partir de los valores de acidez, que evalúa los ácidos libres expresados como porcentaje de ácido oleico. Dada la longitud de los ácidos presentes en las muestras, se cometerán errores por exceso o por defecto, dependiendo de que el peso molecular medio de los ácidos libres sea menor o mayor que el del ácido oleico. No obstante, la importancia del mismo en las muestras de aceite de oliva, hace suponer que el valor de la acidez constituye una medida muy aproximada de los ácidos grasos que han sido hidrolizados pero no absorbidos.

Los resultados obtenidos indican un incremento porcentual de los ácidos totales (fracción saponificable) y una disminución de los ácidos grasos libres, cuando la alteración aumenta, lo que significa un incremento de los ácidos esterificados.

A partir de la tabla XXXV se ha elaborado, calculando las diferencias entre los ácidos totales y libres, en cada caso, la Tabla XXXVI, que resume las cantidades de lípidos no hidrolizados en los diferentes grupos, y sus porcentajes sobre el total de lípidos no absorbidos.

Los resultados son suficientemente expresivos e indican un incremento sustancial de la grasa no hidrolizada con la alteración, tanto en cantidades absolutas como en porcentaje sobre el total de lípidos. En el caso de las heces procedentes de las ratas cuya dieta contiene el 20% de aceite de oliva termoxidado, la grasa no hidrolizada llega a constituir algo más del 50% de la excretada y, aproximadamente, un 25% de la fracción de triglicéridos polares ingeridos. Si se compara este resultado con los obtenidos cuando la dieta contiene aceites de menor alteración e igual porcentaje, o igual alteración y

Tabla XXXVI.- LIPIDOS NO ABSORBIDOS: Determinación cuantitativa de ácidos esterificados.

% ACEITE EN DIETA ACEITE DE OLIVA	6	12	20
(1) NO CALENTADO	0,10 [*] (1,5) ^{**}	0,72 (14,0)	0,51 (11,9)
(2) MEZCLA 50% de (1) y (3)	4,21 (26,1)	5,90 (39,2)	7,08 (41,7)
(3) TERMOXIDADO 150 horas	9,79 (32,4)	13,08 (43,3)	16,44 (54,0)

* g/100 g de grasa ingerida

** g/100g de lípidos no absorbidos

menor porcentaje, se deduce que , tanto el nivel de degradación de la grasa como la concentración de productos de alteración en el tracto intestinal, son variables determinantes de la cantidad de grasa hidrolizada.

c) Cuantificación directa de ácidos grasos no alterados y ácidos dímeros no polares libres y esterificados

Los resultados obtenidos a partir de la evaluación directa mediante cromatografía de exclusión de los lípidos no absorbidos y de la comparación de los ácidos totales con los ácidos libres, permiten detectar la existencia de compuestos glicerídicos en los lípidos no absorbidos y conocer de forma global la cantidad de lípidos excretados no hidrolizados, pero no es posible deducir las cantidades de los distintos grupos de compuestos que se encuentran libres o esterificados.

La determinación sería de particular interés en el caso de los ácidos grasos no alterados, puesto que permitiría comprobar directamente el motivo principal de la disminución de su absorción cuando la grasa está termoxidada.

Los métodos analíticos desarrollados en este trabajo, junto a la posibilidad de utilizar un procedimiento de metilación selectiva, permiten cuantificar directamente los dos grupos de menor polaridad - ácidos grasos no alterados y ácidos dímeros no polares - tanto libres como esterificados y, en consecuencia, sirven de base para diferenciar claramente las fases de hidrólisis enzimática y absorción.

A tal efecto, se han analizado los lípidos no absorbidos procedentes de 2 animales alimentados con dietas que contienen 20% de oliva no calentado y termoxidado 150 horas. La Figura 29 muestra el procedimiento diseñado para diferenciar los ácidos libres de los esterificados, combinando las técnicas analíticas disponibles.

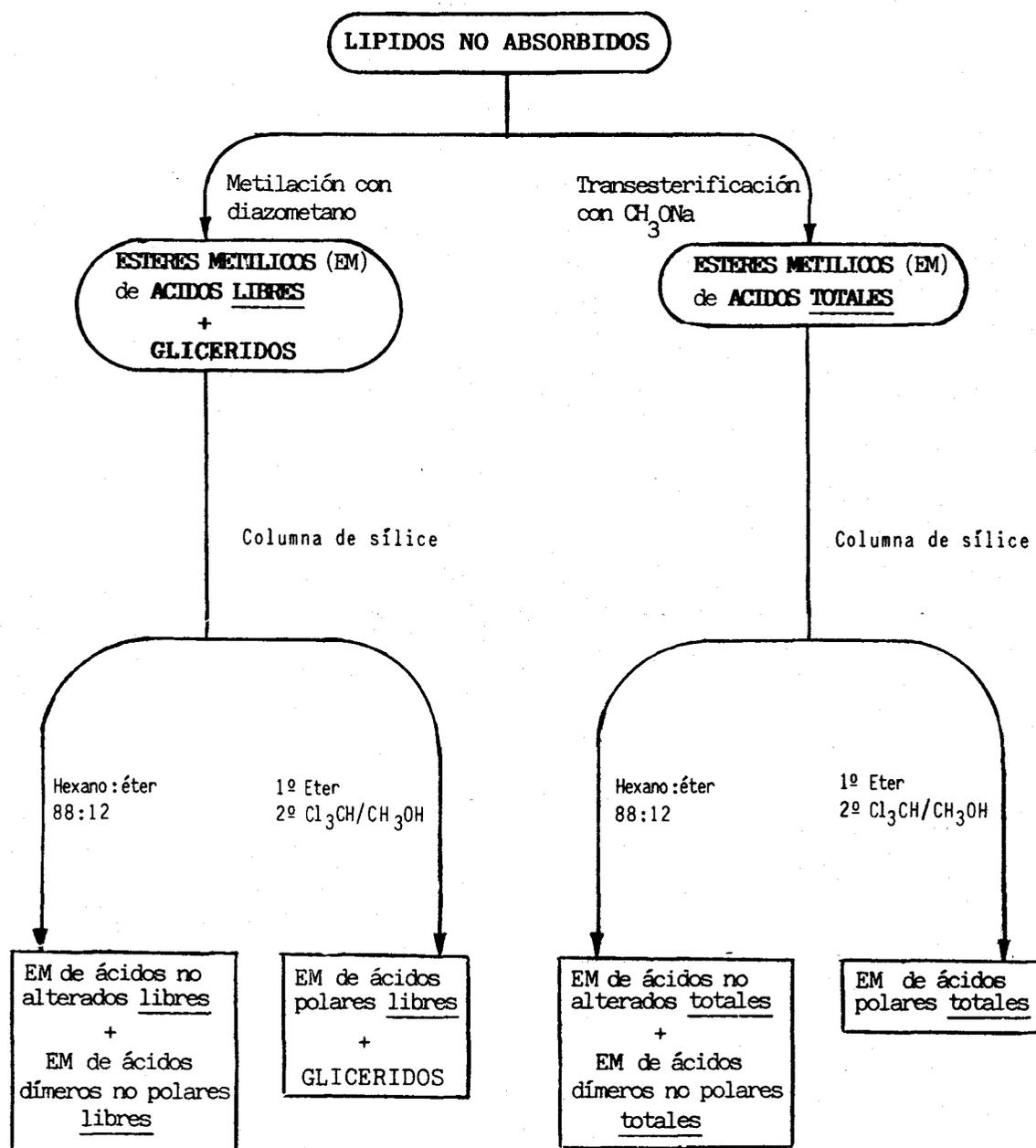


Figura 29.- Esquema analítico general aplicado en la diferenciación de ácidos libres y esterificados.

Procedimiento analítico

a) Obtención de los ésteres metílicos

Se ha llevado a cabo la transesterificación de las dos muestras con CH_3ONa para obtener los ésteres metílicos totales, siguiendo el procedimiento que se indica en el apartado 2.1.2.3. y, en muestras similares, se metilan selectivamente los ácidos grasos libres, utilizando diazometano, como se resume a continuación:

Una corriente de nitrógeno saturada de éter etílico se hace fluir al interior de un tubo que contiene 3 ml de éter etílico, 3 ml de 2-(2-ethoxy-ethoxy)etanol, 3 ml de KOH 60% y 1 g de N-metil-N-nitroso-p-toluensulfonamida. El diazometano generado "in situ" es transportado por la corriente de nitrógeno hasta el vial que contiene la muestra disuelta en éter etílico. La aparición de un color amarillo brillante debido al exceso de diazometano indica el punto final de la metilación, que se comprueba también mediante cromatografía en capa fina.

b) Separación de los ésteres metílicos, por cromatografía en columna y evaluación posterior mediante cromatografía de exclusión

El procedimiento seguido, así como las condiciones cromatográficas, se encuentran detalladas en el apartado 2.1.2.3.

— RESULTADOS Y DISCUSION —

La Tabla XXXVII muestra los resultados de la cuantificación de los ácidos no alterados y dímeros no polares, libres y esterificados. En la mitad inferior de la tabla se recogen también las

Tabla XXXVII.- LIPIDOS NO ABSORBIDOS: Determinación cuantitativa de ácidos grasos no alterados y ácidos dímeros no polares libres y esterificados (g/100 g de grasa ingerida).

		20% Aceite de oliva no calentado	20 % Aceite de oliva termoxidado
ACIDOS NO ALTERADOS	- Totales	1,08	6,12
	- Libres	1,03	2,80
	- Esterificados	0,05*	3,14**
ACIDOS DIMEROS NO POLARES	- Totales	-	3,48
	- Libres	-	2,17
	- Esterificados	-	1,38**
LIPIDOS NO ABSORBIDOS (2,24 g)	LIPIDOS TOTALES	2,24	23,84
	ACIDOS TOTALES	1,35	22,04
	- ACIDOS LIBRES	1,23	7,72
	- ACIDOS ESTERIFICADOS	0,12	14,32
<u>GRASA</u> <u>INGERIDA</u>	GRASA TOTAL	100	100
	- ACIDOS NO ALTERADOS	98,5	65,30
	- ACIDOS DIMEROS NO POLARES	-	3,67

* Determinado por diferencia

** Determinado por cromatografía de exclusión

cantidades ingeridas de los dos grupos de compuestos de interés, así como los valores obtenidos para los ácidos libres y esterificados totales.

Como puede observarse, los resultados apoyan nuevamente las conclusiones obtenidas en los dos apartados precedentes, ya que las cantidades de ácidos no alterados y ácidos dímeros no polares esterificados, son muy elevadas cuando los animales ingieren la grasa termoxidada, demostrando la mayor dificultad en la fase de hidrólisis enzimática.

No obstante, pueden establecerse diferencias claras entre ambos grupos de compuestos. Así, la cuantificación de los ácidos grasos indica que la principal diferencia entre ambas muestras se encuentra en la fracción de ácidos esterificados, lo que implica que la disminución de la digestibilidad de los ácidos no alterados con la alteración, está directamente relacionada con la etapa de hidrólisis enzimática. La mayor cantidad de ácidos libres obtenida cuando la dieta contiene la grasa termoxidada, puede explicarse por la contribución de los ácidos de origen endógeno, como se dedujo en el apartado 2.3.1.

La situación, sin embargo, es muy distinta para los ácidos dímeros no polares, ya que más de la mitad de las cantidades ingeridas se encuentra libre y su digestibilidad es prácticamente nula. De este resultado sólo puede deducirse que la hidrólisis enzimática no es la etapa limitante en su absorción.

En resumen, del estudio de los ácidos libres y esterificados presentes en los lípidos no absorbidos, se destacan las siguientes conclusiones:

- 1º) El análisis mediante cromatografía de exclusión permite deducir que la hidrólisis enzimática que tiene lugar antes de la absorción no es completa, en el caso de los glicéridos complejos de elevado peso molecular.

- 2º) La relación observada entre las cantidades globales de ácidos totales y libres demuestra que la extensión de la hidrólisis depende del grado de alteración de la grasa y del porcentaje de grasa en la dieta.
- 3º) La cuantificación de ácidos grasos no alterados y ácidos dímeros no polares libres y esterificados, permite establecer una clara diferenciación entre las fases de hidrólisis enzimática y absorción para estos dos grupos de menor polaridad.

En el caso de los ácidos grasos no alterados, la menor digestibilidad encontrada para el aceite termoxidado se debe fundamentalmente a una hidrólisis enzimática incompleta. Por el contrario, los valores de digestibilidad de los ácidos dímeros no polares, junto a la elevada cantidad de ácidos presentes en forma libre, indican dificultades en la etapa de absorción.

**2.3.3.- Absorción de moléculas poliméricas
de ácido [1-¹⁴C]-linoleico**

Una de las conclusiones más interesantes que se deducen de la evaluación cuantitativa de los compuestos de alteración no absorbidos, es la desaparición en el tracto intestinal de una considerable cantidad de ácidos poliméricos.

El hecho es particularmente sorprendente si se consideran las características de los citados compuestos, desde dos puntos de vista:

1) Su dificultad de absorción, al ser moléculas de peso molecular superior al de los triglicéridos.

2) La dificultad de hidrólisis enzimática de los polímeros de triglicéridos, que tendría como consecuencia una baja cantidad de ácidos poliméricos liberados en relación a los ingeridos. Esto significaría que las tasas de absorción encontradas estarían infravaloradas, puesto que una parte significativa de los compuestos de polimerización no tendrían posibilidad de ser absorbidos mientras se encuentren esterificados.

Para justificar los resultados obtenidos se ha establecido la siguiente hipótesis: puede suceder que, durante el proceso de digestión, se produzcan modificaciones en las moléculas de polímeros de triglicéridos o de ácidos grasos, que disminuyan su peso molecular y,

en estas circunstancias, su absorción sería posible. La idea se apoya en las referencias existentes sobre modificaciones químicas de los ácidos grasos en medio ácido fuerte, que afectarían particularmente a las uniones peróxido y puente éter de ácidos oxidados (213-215).

En este apartado se analizan y discuten los resultados obtenidos en una experiencia planteada para contrastar la hipótesis indicada. Para ello se ha utilizado ácido [1-¹⁴C]-linoleico sometido a polimerización oxidativa a elevada temperatura y en presencia de aire.

Planteamiento de la experiencia

Respecto a los ensayos anteriores, en esta experiencia destacan dos características de interés relacionadas con las muestras:

1) Se parte del ácido linoleico en vez de triglicéridos, para eliminar las dificultades existentes en la fase previa de hidrólisis enzimática. La administración del ácido garantiza que toda la cantidad ingerida tiene teóricamente la posibilidad de ser absorbida.

2) La muestra de ácido administrada se obtiene a partir de 2 muestras, sometidas respectivamente a condiciones de oxidación a elevada temperatura, para favorecer la formación de los compuestos de polimerización, y a condiciones de alteración térmica en ausencia de oxígeno, para favorecer la formación de dímeros no polares. La muestra alterada garantiza así la posibilidad de comparar los grupos de compuestos de mayor interés, ya que la desaparición de los compuestos de polimerización resultaba aún más sorprendente debido a la baja absorción de los dímeros no polares.

Preparación de las muestras

A partir de 20 g de ácido [1-¹⁴C]-linoleico (14,25 μ Ci/g) se preparan 2 muestras, que reciben los siguientes tratamientos:

- a) 10 g de muestra se someten a oxidación forzada con aire, a 180°C durante 100 horas. En estas condiciones tiene lugar polimerización oxidativa, con formación de dímeros y polímeros oxidados.
- b) 10 g de muestra se mantienen durante 200 horas a 200°C, en presencia de nitrógeno. En estas condiciones se obtienen fundamentalmente dímeros de uniones C-C, de baja polaridad.

Una vez concluidos los tratamientos, se unen ambas muestras y se separa mediante cromatografía en columna de sílice, en 3 fracciones de distinta polaridad, siguiendo el procedimiento que se indica a continuación:

1) Preparación de la columna:

Se pesan en un matraz 250 g de silicagel 60 y se añaden 450 ml de hexano-éter etílico 50:50. La mezcla se transfiere a una columna de vidrio de 60 cm de altura y 3,6 cm de d.i., eliminándose el disolvente en exceso, sin que en ningún momento deje de cubrir la sílice y agregándose finalmente 4 g de arena de mar, para facilitar la posterior fijación de la muestra.

2) Procedimiento operatorio:

La muestra de, aproximadamente, 20 g, se diluye con 50 ml de la mezcla de hexano-éter etílico 50:50 y esta disolución se transfiere a la columna con ayuda de una pipeta.

Las fracciones obtenidas son las siguientes:

- I.- Fracción eluida con 1,5 l de hexano-éter etílico 50:50, constituida por ácido linoleico no alterado.
- II.- Fracción eluida con 1,5 l de hexano-éter etílico 40:60, desechada por tratarse de una fracción intermedia que contiene todavía linoleico no alterado y compuestos de alteración de baja polaridad.
- III.- Fracción eluida con 1,5 l de éter etílico-metanol 50:50, constituida mayoritariamente por dímeros y polímeros.

Las fracciones I y III constituyen, respectivamente, las muestras de linoleico no alterado y linoleico alterado, utilizadas en esta experiencia. Las características de estas muestras se detallan posteriormente y se recogen en la Tabla XXXVIII.

Animales y tratamiento

Se han alimentado 2 grupos de ratas Wistar, de 4 animales cada uno, con la dieta alipídica pura utilizada anteriormente, a la que se añade aceite de oliva al 10% y ácido [1-¹⁴C]-linoleico al 1%.

Para cada grupo diferenciado, las características respectivas de la muestra de ácido [1-¹⁴C]-linoleico son las siguientes:

- 1.- Fracción de ácido [1-¹⁴C]-linoleico no alterado (14,94 μ Ci/g).
- 2.- Fracción de ácido [1-¹⁴C]-linoleico alterado (13,05 μ Ci/g), con garantía de ausencia del ácido no alterado. La segunda dieta contiene, por tanto, un 10% de ácido alterado en el total de los lípidos presentes.

Los animales se mantienen en jaulas de metabolismo, efectuando un estricto control de las cantidades ingeridas y excretadas durante el periodo experimental, que es de una semana.

Tabla XXXVIII.- Características de las muestras radiactivas utilizadas en las dietas.

	[1- ¹⁴ C]-LINOLEICO NO ALTERADO	[1- ¹⁴ C]-LINOLEICO ALTERADO
Acido no alterado	96,2	n.d.*
Acidos monómeros oxidados	4,8	14,5
Acidos dímeros no polares	-	6,9
Acidos dímeros oxidados	-	27,1
Acidos polímeros	-	51,5

* n.d. no detectable

Metodología analítica

La extracción de los lípidos no absorbidos se realiza según el procedimiento expuesto en el apartado 2.2.1.

Las muestras de grasa utilizadas en las dietas y las muestras de lípidos no absorbidos se analizan siguiendo 3 vías complementarias:

- a) Medida de la radiactividad total mediante un contador de centelleo líquido 1215 de LKB.

La determinación se realiza tomando alícuotas de las muestras, por duplicado, y disponiéndolas en viales de centelleo, a los que se añade 10 ml de una mezcla tolueno:PCS (líquido de centelleo de Amersham) (1:2, V/V). Los viales se introducen en el contador y éste, debidamente calibrado, mide la radiactividad que contiene, en desintegraciones por minuto (DPM).

- b) Separación de las muestras mediante cromatografía en capa fina (líquido de desarrollo: hexano-éter etílico 70:30) y evaluación de la radiactividad porcentual de las bandas aisladas, en un analizador lineal BERTHOLD LB 2820-1, que permite la cuantificación directamente sobre la misma placa.

- c) Obtención de los ésteres metílicos con diazometano, separación por cromatografía en columna de sílice, de las fracciones polar y no polar (eluidas respectivamente con hexano-éter 88:12 y éter) y determinación cuantitativa de compuestos específicos mediante cromatografía de exclusión. El desarrollo y utilización de estos métodos analíticos han sido anteriormente descritos, en apartados previos a este estudio.

— RESULTADOS Y DISCUSION —

La Figura 30 recoge los registros obtenidos en el analizador lineal, para las muestras de linoleico no alterado y alterado, ingeridas por los animales experimentales. La Figura 31 muestra los cromatogramas correspondientes a las mismas muestras, obtenidos mediante cromatografía de exclusión.

Mediante la comparación de ambas figuras es posible subrayar los siguientes puntos de interés:

- 1º) Los compuestos polímeros formados en las condiciones termoxidativas establecidas constituyen un alto porcentaje de la muestra alterada, con lo que se ha alcanzado uno de los objetivos propuestos en el planteamiento de la experiencia.
- 2º) Se comprueba claramente la ausencia de restos no alterados en la muestra de linoleico alterado.
- 3º) Sin embargo, en la muestra de linoleico no alterado, están presentes ácidos alterados, aproximadamente en un 4%. El registro obtenido mediante cromatografía de exclusión muestra que son ácidos monómeros.

En la Tabla XXXVIII se recogen las características de las muestras ingeridas. La cuantificación se ha realizado mediante cromatografía de exclusión, previa separación en columna de sílice de los ésteres metílicos obtenidos con diazometano.

Los resultados son prácticamente idénticos a los obtenidos directamente en la muestra de ácido (Figura 30), con la ventaja de poder cuantificar separadamente los dos grupos de dímeros.

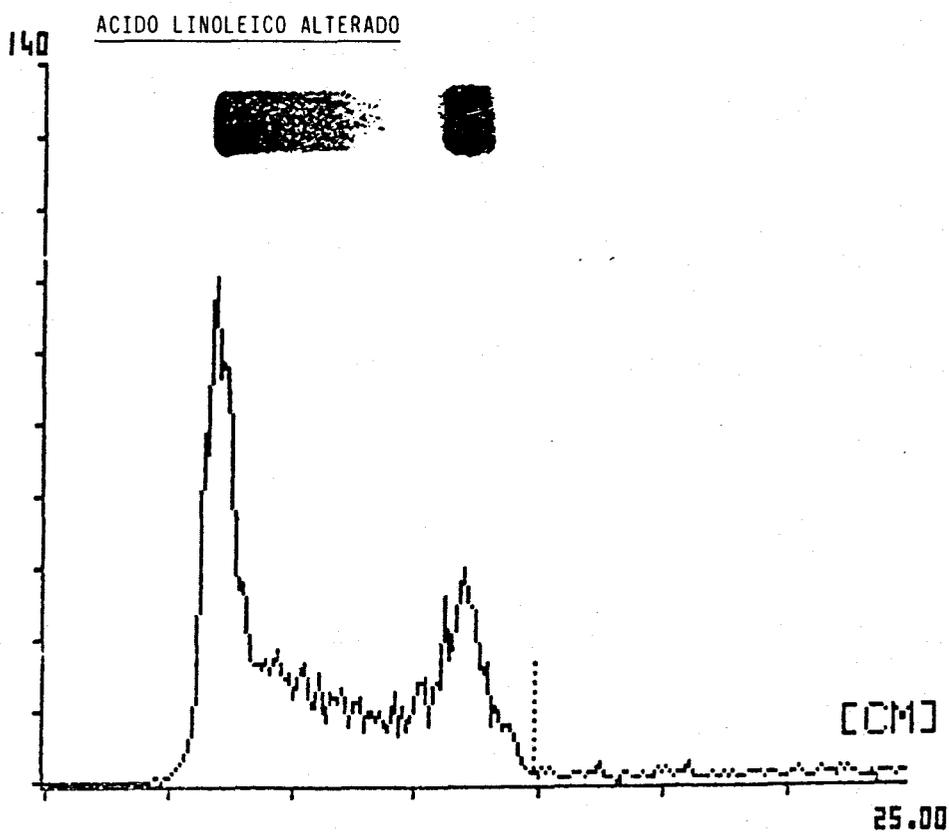
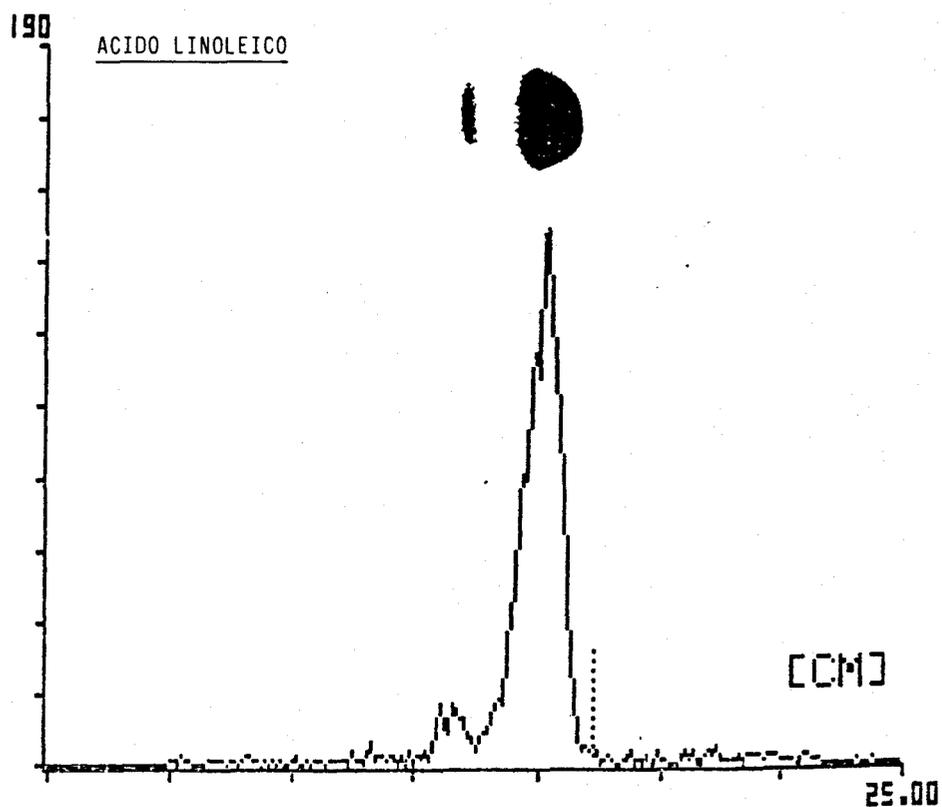


Figura 30.- Distribución de la radiactividad en las muestras iniciales.

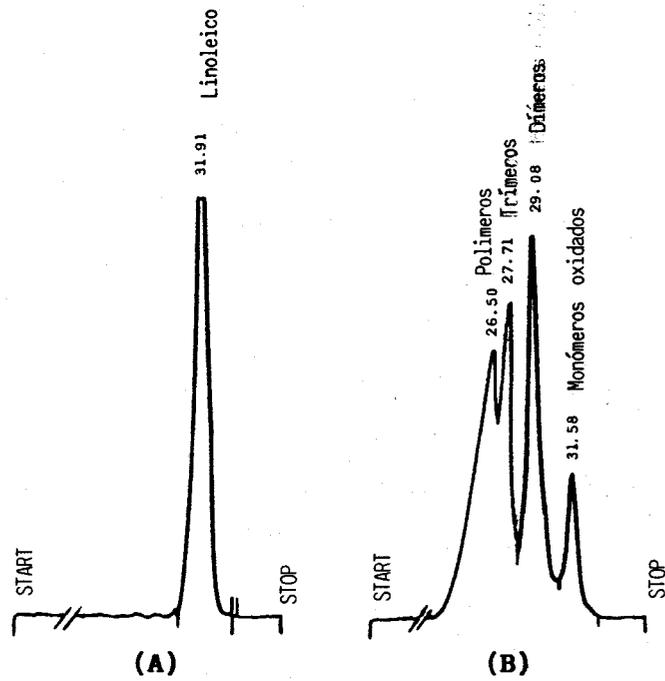


Figura 31.- Cromatogramas representativos del ácido linoleico no alterado (A) y alterado (B).

En relación con los lípidos no absorbidos, las Tablas XXXIX y XL muestran los resultados obtenidos para los animales alimentados con ácido linoleico. En la primera de ellas, se recogen los resultados clásicos de pesos ingeridos y excretados, y las digestibilidades aparentes, mientras la Tabla XL resume los valores de digestibilidad de los compuestos marcados, exclusivamente, ya que se ha obtenido a partir de los valores de radiactividad ingerida y excretada. En este caso, en que la muestra carece prácticamente de alteración, los valores más bajos de digestibilidad de la Tabla XXXIX, se deben, fundamentalmente, a la existencia de grasa endógena que, lógicamente, no está evaluada en la última tabla.

De mayor interés son los datos resumidos en las Tablas XLI y XLII, que se refieren al grupo que ha sido alimentado con la muestra de ácido linoleico alterado. Como puede observarse, la tabla que recoge los datos de peso, muestra una digestibilidad media del 90%, que es significativamente inferior a la obtenida para la dieta que contiene ácido linoleico, lo que indica la menor digestibilidad del ácido alterado. No obstante, resultan espectacularmente altos los valores de digestibilidad obtenidos a partir de la medida de radiactividad, en comparación con los encontrados cuando se administraban las muestras como triglicéridos. Las diferencias tienen que estar justificadas, en parte, por la dificultad de acción de los enzimas proteolíticos, y, además, por la forma de preparación de la muestra, que favorece la formación de dímeros y polímeros de menor estabilidad.

Igualmente interesante es la comprobación de la importancia de la fracción lipídica obtenida tras hidrólisis ácida de las muestras de heces, después de la extracción directa en Soxhlet. La Tabla XLIII muestra las cantidades de ambas fracciones en cada caso y la diferencia de radiactividad presente en las mismas. En la última columna se indican los mg de grasa correspondientes a la radiactividad presente, y son suficientemente expresivos de la necesidad de extraer la grasa tras hidrólisis ácida, para una buena cuantificación de los compuestos de alteración.

Tabla XXXIX.- Animales alimentados con ácido [1-¹⁴C]-linoleico: lípidos totales ingeridos y excretados (g) y digestibilidades aparentes.

DIETA (g)	GRASA TOTAL EN DIETA (g)	Acido [1- ¹⁴ C]-linoleico ingerido (g)	LIPIDOS NO ABSORBIDOS (g)	DIGESTIBILIDAD APARENTE
1) 84,2	9,328	0,848	0,438	95,3
2) 90,2	9,922	0,902	0,510	95,6
3) 92,0	10,120	0,920	0,591	94,2
4) 94,5	10,395	0,945	0,533	94,9

Tabla XL.- Animales alimentados con ácido [1-¹⁴C]-linoleico: Balance global de compuestos marcados con ¹⁴C.

	INGERIDO (DPM × 10 ³)	EXCRETADO (DPM × 10 ³)	ABSORBIDO (%)
1)	28.125	920	96,7
2)	29.916	957	96,8
3)	30.513	855	97,2
4)	31.343	783	97,5

Tabla XLI.- Animales alimentados con ácido [1-¹⁴C]-linoleico alterado: lípidos totales ingeridos y excretados (g) y digestibilidades aparentes.

DIETA (g)	GRASA TOTAL EN DIETA (g)	Acido [1- ¹⁴ C]-linoleico ingerido (g)	LIPIDOS NO ABSORBIDOS (g)	DIGESTIBILIDAD APARENTE
1) 95,5	10,50	0,955	0,804	92,3
2) 95,2	10,47	0,952	1,265	87,9
3) 99,5	10,94	0,995	1,194	89,1
4) 93,2	10,25	0,932	0,952	90,7

Tabla XLII.- Animales alimentados con ácido [1-¹⁴C]-linoleico alterado: Balance global de compuestos marcados con ¹⁴C.

	INGERIDO (DPM x 10 ³)	EXCRETADO (DPM x 10 ³)	ABSORBIDO (%)
1)	27.667	8.631	68,8
2)	27.580	8.506	69,2
3)	28.826	7.934	72,5
4)	27.001	8.142	69,8

Tabla XLIII.- Animales alimentados con ácido [1-¹⁴C]-linoleico alterado: lípidos no absorbidos y radiactividad presente en las fracciones obtenidas por extracción directa y tras hidrólisis ácida.

		LIPIDOS TOTALES		Acido [1- ¹⁴ C]-linoleico
		(mg)	(DPM x 10 ³)	(mg equivalentes)
1)	Extracción directa	431	2531	87,4
	" tras hidrólisis	373	6100	210,5
2)	Extracción directa	708	2371	81,8
	" tras hidrólisis	557	6135	211,8
3)	Extracción directa	653	2108	72,8
	" tras hidrólisis	541	5826	201,0
4)	Extracción directa	530	2340	80,7
	" tras hidrólisis	402	5802	200,3

Las Figuras 32 y 33 recogen los registros correspondientes a las dos fracciones de lípidos no absorbidos obtenidos de uno de los animales alimentados con linoleico alterado. En ellas, se incluyen los datos cuantitativos más significativos.

Un análisis comparativo de los registros muestra la mayor concentración en compuestos de polaridad elevada en la fracción de lípidos obtenida tras hidrólisis ácida, y la sorprendente aparición de ácidos libres no alterados marcados, en la primera fracción. Puesto que la muestra administrada no contenía ácido linoleico, la presencia en los lípidos no absorbidos de ácido no alterado es de indiscutible interés.

Dada la importancia de este resultado, se ha realizado una concentración de los ácidos para determinar la estructura de los ácidos marcados. Para ello, se han seguido los siguientes pasos:

1º) Aislamiento y concentración de los ácidos grasos no alterados

La separación de la muestra total mediante cromatografía en capa fina se lleva a cabo con hexano-éter etílico 70:30 como líquido de desarrollo. La banda correspondiente a los ácidos grasos no alterados se aísla con ayuda de una espátula y la sílice se eluye en una pequeña columna, utilizando 15 ml de cloroformo. Esta operación se repite en varias placas, hasta obtener cantidad suficiente de muestra.

La Figura 34 muestra el registro obtenido con el analizador lineal, después de realizar un desarrollo en capa fina de los ácidos grasos aislados, donde puede observarse el buen aislamiento conseguido.

2º) Obtención de los ésteres metílicos

Se lleva a cabo la metilación de los ácidos grasos aislados, con diazometano, siguiendo el procedimiento detallado previamente.

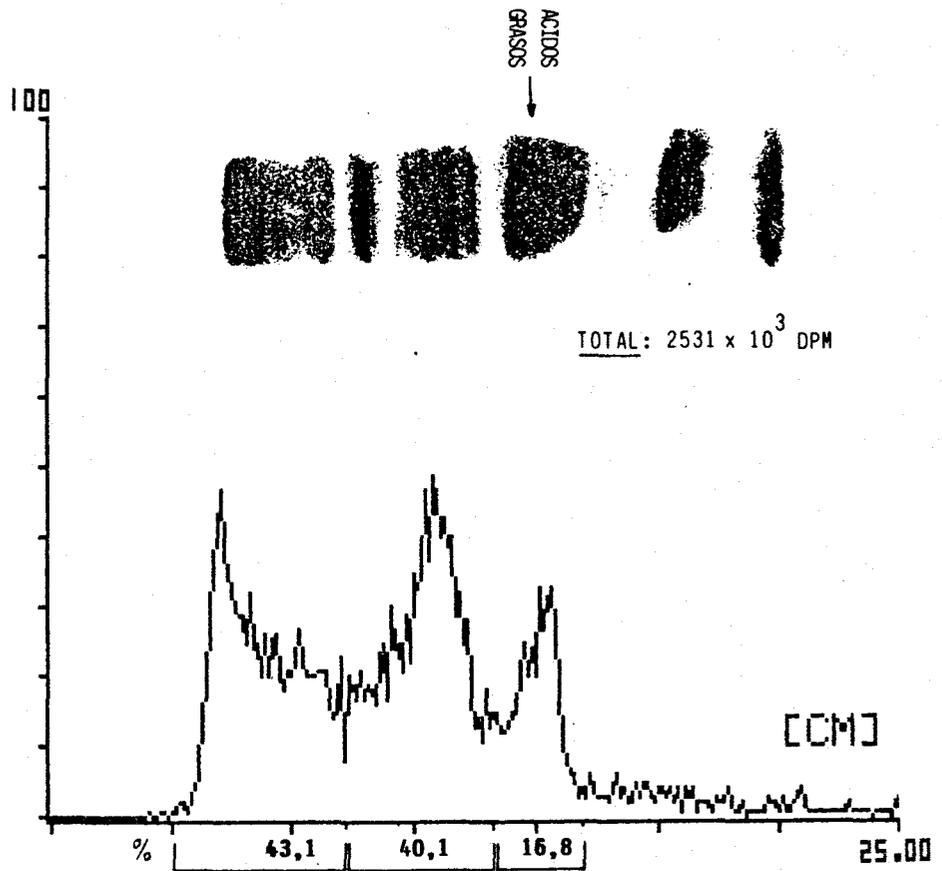


Figura 32.- Distribución de la radiactividad en lípidos no absorbidos obtenidos por extracción directa.

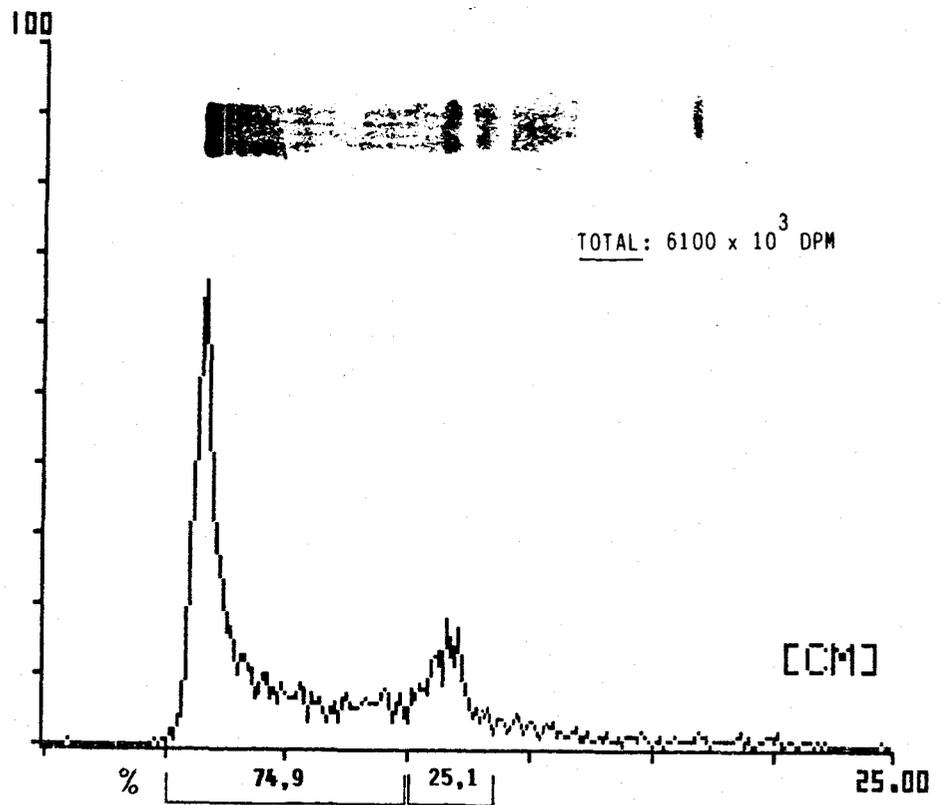


Figura 33.- Distribución de la radiactividad en lípidos no absorbidos obtenidos tras hidrólisis ácida.

La Figura 35 muestra el registro, obtenido mediante analizador lineal, correspondiente a los ésteres metílicos, donde se observa, nuevamente, la existencia de una única banda radiactiva. Tanto en el caso de los ésteres metílicos como en el de los ácidos grasos, se ha comprobado la identidad de los Rf, desarrollando en las mismas placas los correspondientes patrones.

3º) Separación de los ésteres metílicos

Se ha realizado seguidamente el desarrollo de los ésteres metílicos mediante cromatografía en capa fina, en placa de NO_3Ag , para conocer la distribución de los ácidos marcados según su grado de insaturación.

La Figura 36 recoge el registro correspondiente, del analizador lineal, donde se confirma que la mayor parte de la muestra radiactiva está constituida por ácido linoleico, y un pequeño porcentaje de ácido oleico. Este último podría ser originado como consecuencia del proceso de hidrogenación efectuado por microorganismos de la flora intestinal, sobre compuestos de distinta naturaleza, tal y como se ha comprobado anteriormente en el apartado 2.3.1., para el caso concreto de compuestos de naturaleza esteroide.

Finalmente, la Tabla XLIV resume los resultados de la cuantificación de los principales grupos de compuestos no absorbidos, mediante las técnicas cromatográficas de adsorción y exclusión, aplicadas a los ésteres metílicos.

Los valores obtenidos para los ácidos no alterados y para los monómeros oxidados, son difíciles de interpretar, puesto que, en ambos casos, están incluidos los de origen endógeno. Para los grupos de mayor interés, sin embargo, se comprueban de nuevo las conclusiones obtenidas previamente, aunque las digestibilidades para los dímeros y polímeros oxidados son mucho más elevadas.

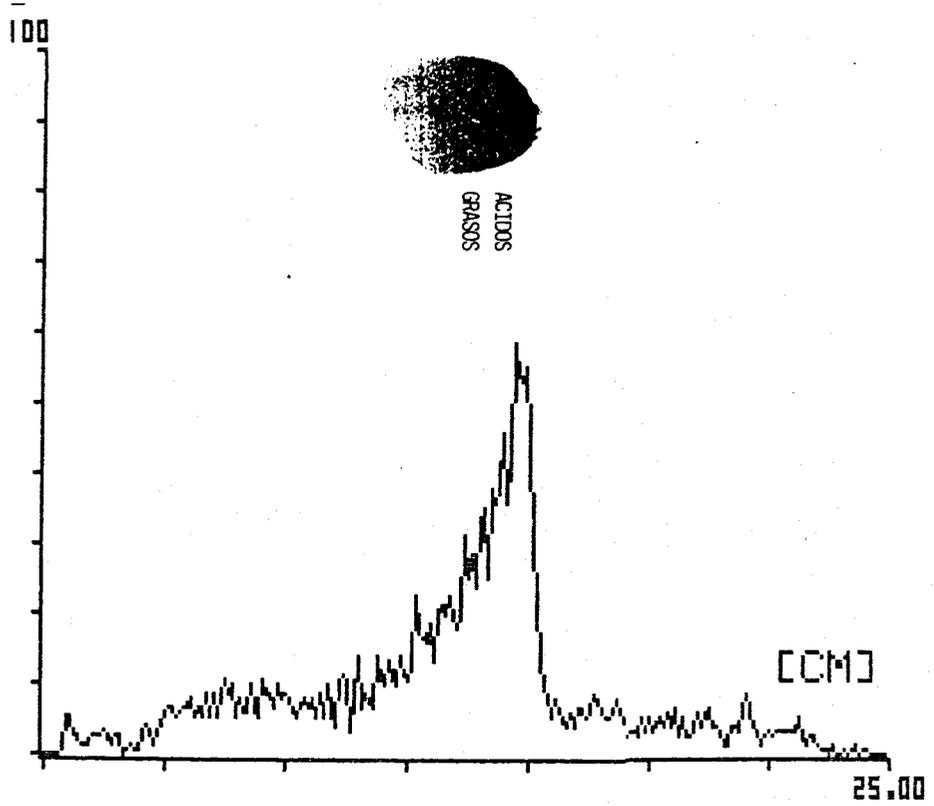


Figura 34.- Radiactividad presente en la fracción de ácidos grasos aislados a partir de los lípidos no absorbidos.

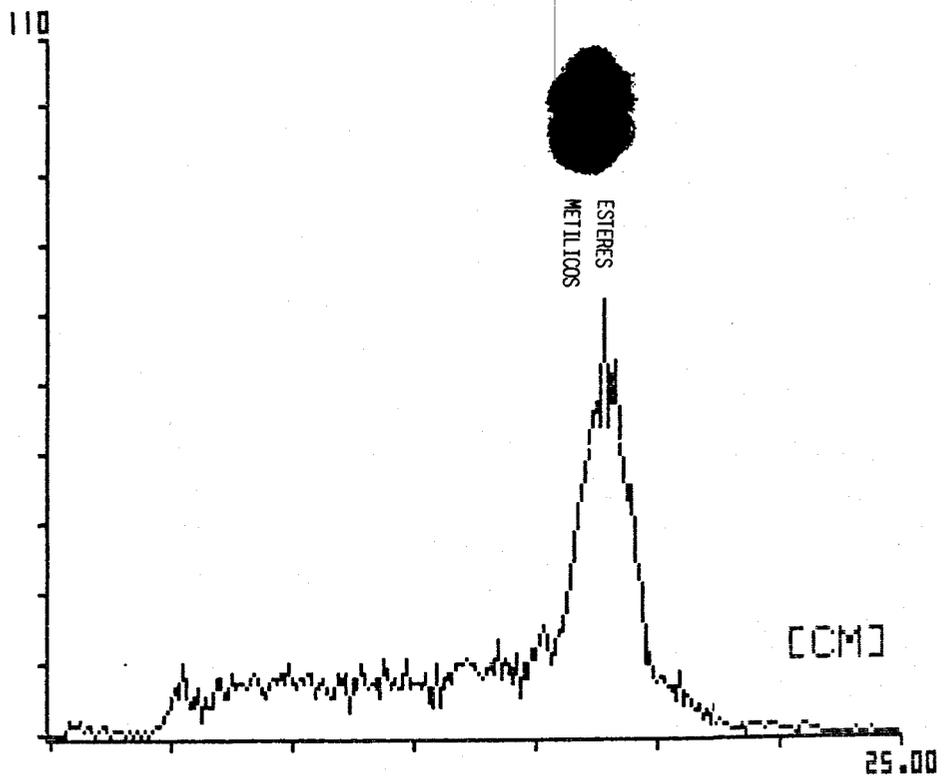


Figura 35.- Radiactividad presente en los ésteres metílicos de los ácidos aislados.

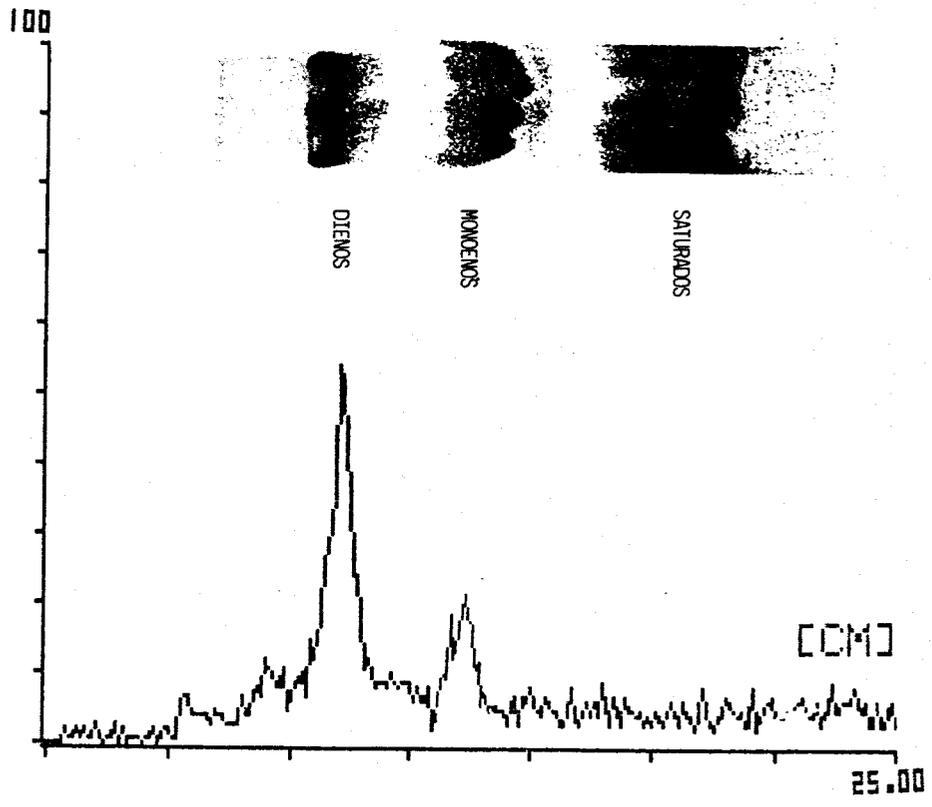


Figura 36.- Distribución de la radiactividad en los ésteres metílicos de ácidos grasos.

Tabla XLIV.- Animales alimentados con ácido [1-¹⁴C]-linoleico alterado: Cantidades medias ingeridas, excretadas y digestibilidades aparentes de ácidos monómeros, dímeros y polímeros.

	INGERIDO	EXCRETADO	DIGESTIBILIDAD
TOTAL (g)	10,54	1,054	90,0
Acidos no alterados (g)	9,58	0,68	92,9

Acidos monómeros oxidados (mg)	138,9	53,9	61,2
Acidos dímeros no polares (mg)	69,0	62,8	9,0
Acidos dímeros oxidados (mg)	259,6	66,3	74,5
Acidos polímeros (mg)	493,4	149,2	69,8

Por otra parte, es interesante comprobar la complementariedad de las técnicas empleadas. La medida de la radiactividad presente en las muestras no permite conocer la distribución en grupos de compuestos de distinto peso molecular, mientras que la detección del ácido linoleico marcado no hubiera sido posible utilizando las técnicas clásicas, por ser este ácido uno de los constituyentes de los ácidos de origen endógeno y del aceite de oliva de la dieta.

En este sentido, la Tabla XLV recoge las cantidades de ácidos marcados de los diferentes grupos separados mediante cromatografía de exclusión, que han sido calculados a partir de los resultados obtenidos con ambas técnicas, teniendo en cuenta las siguientes relaciones:

- 1) Una vez separada la muestra en columna de sílice, la evaluación de la radiactividad presente en ambas fracciones, permite distribuir las cantidades de ácidos marcados según se indica a continuación:

$$\frac{\text{RADIATIVIDAD EN}}{\text{FRACCION MENOS POLAR}} = \text{Radiactividad presente en } \underline{\underline{\text{ácidos no alterados}}} + \text{Radiactividad presente en } \underline{\underline{\text{dímeros no polares}}} \quad (1)$$

$$\frac{\text{RADIATIVIDAD EN}}{\text{FRACCION POLAR}} = \text{Radiactividad presente en } \underline{\underline{\text{monómeros oxidados}}} + \text{Radiactividad presente en } \underline{\underline{\text{dímeros oxidados}}} + \text{Radiactividad presente en } \underline{\underline{\text{polímeros}}} \quad (2)$$

- 2) La evaluación de la cantidad de ácido no alterado marcado, mediante el analizador lineal, permite calcular a partir de (1), la cantidad de ácidos dímeros no polares radiactivos.
- 3) Dado que los dímeros oxidados y polímeros, no solapan prácticamente con ninguno de los componentes presentes en los lípidos de origen endógeno, las cantidades obtenidas mediante cromatografía de exclusión, evalúan la cantidad de ácidos marcados presentes, de ambos grupos, y, por tanto, los ácidos monómeros oxidados pueden calcularse según (2) por diferencia.

Tabla XLV.- Animales alimentados con ácido [1-¹⁴C]-linoleico alterado:
Balance de ácidos monómeros, dímeros y polímeros, marcados
con ¹⁴C.

	INGERIDO (mg)	EXCRETADO (mg)	ABSORBIDO (%)
TOTAL	958	287	
Acidos no alterados	-	8,0	Negativo

Acidos monómeros oxidados	138,9	12,5	91,0
Acidos dímeros no polares	69,0	51,1	25,9
Acidos dímeros oxidados	259,6	66,3	74,5
Acidos polímeros	493,4	149,2	69,8

De la comparación de las Tablas XLIV y XLV se deduce que las digestibilidades de los ácidos oxidados monómeros y ácidos dímeros no polares aumentan significativamente debido a la presencia, en la primera de las tablas indicadas, de los lípidos de origen interno, así como de una pequeña cantidad de dímeros procedente del aceite de oliva de la dieta, respectivamente.

En resumen, a partir de los resultados obtenidos en esta experiencia, se deducen las siguientes conclusiones:

- 1º) La aparición de ácidos grasos no alterados marcados, demuestra la existencia de modificaciones en los ácidos alterados durante el proceso de digestión. Además, teniendo en cuenta la elevada digestibilidad de los ácidos grasos no alterados, el hecho de que estén presentes en cantidades detectables, aún pequeñas, después de la absorción, indica claramente que ha tenido lugar un grado de transformación notable.
- 2º) La elevada proporción en la muestra radiactiva de los dímeros y polímeros oxidados (78,6%), indica que tales compuestos son los principales afectados de modificaciones estructurales, lo que justificaría, tanto su desaparición durante el proceso, como sus elevadas digestibilidades.
- 3º) La baja digestibilidad encontrada para los ácidos dímeros no polares demuestra, por el contrario, la elevada estabilidad de la molécula e implica que su tamaño molecular es ya elevado para atravesar la membrana intestinal.

3.- RESUMEN Y CONCLUSIONES

1º.- El procedimiento analítico propuesto, que utiliza una combinación de las técnicas cromatográficas de adsorción y exclusión, contribuye a mejorar la evaluación de las grasas termoxidadas, desde un doble aspecto:

a) El análisis directo de la grasa permite cuantificar la degradación total de la muestra así como la participación de las tres alteraciones predominantes: térmica, oxidativa e hidrolítica.

b) La determinación adaptada al análisis de los ésteres metílicos, permite separar y cuantificar 5 grupos de compuestos: ácidos no alterados, monómeros oxidados, dímeros térmicos, dímeros oxidados y polímeros.

2º.- La determinación cuantitativa de los distintos grupos de ácidos ha sido aplicada al conocimiento de las posibilidades de absorción de las grasas termoxidadas. Con este fin, y después de definir las mejores condiciones de aplicación, se ha desarrollado una amplia experiencia con 9 grupos de ratas Wistar, combinando tres niveles de alteración y tres diferentes porcentajes de grasa en la dieta. Los resultados más destacables se resumen en los siguientes puntos:

a) La cantidad de grasa no absorbida aumenta con el nivel de alteración. No se han encontrado, sin embargo, diferencias significativas debidas al porcentaje de grasa en la dieta.

b) Los valores de digestibilidad más elevados corresponden a los ácidos monómeros no alterados y oxidados, mientras los menores valores se obtienen para los dímeros no polares, originados como consecuencia de la elevada temperatura.

c) El incremento de alteración de la grasa de la dieta origina una disminución en la absorción de los ácidos no alterados y valores negativos de digestibilidad para la fracción insaponificable.

d) Las digestibilidades de los ácidos poliméricos son significativamente más elevadas que las obtenidas para los dímeros no polares.

3º.- Se han desarrollado estudios específicos para profundizar en la significación de los resultados obtenidos, cuyas conclusiones se resumen a continuación:

a) Existe un incremento de los lípidos endógenos cuando aumenta la alteración de la grasa. La cuantificación, en los lípidos no absorbidos, de esteroides y ácidos no polares no presentes en la dieta demuestra, sin lugar a dudas, que el incremento afecta tanto a la fracción insaponificable procedente de las secreciones intestinal y hepática, como a los compuestos originados en el metabolismo de la flora intestinal.

b) La disminución de la digestibilidad de la grasa con la alteración se debe tanto a la dificultad de absorción de los ácidos de elevado peso molecular como a una deficiente acción de la lipasa pancreática. La dificultad de hidrólisis enzimática ha sido confirmada en estudios "in vitro" y deduciendo la acción "in vivo" del enzima, a partir de la cuantificación de los ácidos libres y esterificados en los lípidos no absorbidos.

c) La pérdida de la digestibilidad de los ácidos grasos al aumentar la alteración de la grasa de la dieta se debe, fundamentalmente, a una hidrólisis enzimática incompleta. Por el contrario, la baja digestibilidad de los dímeros no polares es atribuible a dificultades en la fase de absorción. Estas conclusiones se

deducen de las elevadas cantidades de ácidos grasos esterificados y de ácidos dímeros libres presentes en los lípidos no absorbidos.

d) La digestibilidad aparente de los ácidos poliméricos puede ser debida a la existencia de modificaciones previas a la absorción que disminuyan su peso molecular. Estudios realizados con ácido linoleico marcado con ^{14}C demuestran este hecho y confirman nuevamente la mayor digestibilidad de los compuestos de polimerización frente a los dímeros de origen térmico.

4º.- Finalmente, la elevada digestibilidad de los compuestos monómeros de oxidación y la posibilidad de cambios estructurales en las moléculas de polímeros de ácidos oxidados, demuestran la necesidad de profundizar prioritariamente en la significación nutricional de los compuestos originados por vía oxidativa.

4.- BIBLIOGRAFIA

- (1).- Nawar, W.W.- Flavor Chemistry of Fats and Oils. Ed.Min, D.B. y Smouse, T.H.- Am. Oil Chemists' Soc. (1985) 39-60
- (2).- Artman, N.R.- Advances in Lipids Research 7 (1969) 245-330
- (3).- Artman, N.R. y Alexander, J.C.- J. Am. Oil Chemists' Soc. 45 (1968) 643-648
- (4).- Artman, N.R. y Smith, D.E.- J. Am. Oil Chemists' Soc. 49 (1972) 318-326
- (5).- Stevenson, S.G., Vaisey-Genner, M. y Esken, N.A.M.- J. Am. Oil Chemists' Soc. 61 (1984) 1102-1107
- (6).- Viola, P. y Bianchi, A.- Frying of Food.- Ed. Varela, G., Bender, A.E. y Morton, I.D.- V.C.H., Chichester (1988) 129-140
- (7).- Haumann, B.F.- J. Am. Oil Chemists' Soc. 64 (1987) 789-794
- (8).- Mielke, S.- 10th Scandinavian Symposium on Lipids.- Ed. Marcuse,R. Proceedings Lipidforum.- Goteborg,Sweden (1986) 4-11
- (9).- Orthoefer, .- J. Am. Oil Chemists' Soc. 74 (1987) 795-799
- (10).- Barran, W.L.- J. Am. Oil Chemists' Soc. 61 (1984) 832-833
- (11).- Keijbets, M.J.H., Ebbenhorst-Seller, G. y Ruisch, J.- J. Am. Oil Chemists' Soc. 62 (1985) 720-724
- (12).- Toma, R.B., Leung, H.K.,Augustin, J. y Iritani, W.M.- J. Food Sc. 51 (1986) 1213-1215
- (13).- Purdy, R.H.- J. Am. Oil Chemists' Soc. 62 (1985) 523-525
- (14).- Purdy, R.H.- J. Am. Oil Chemists' Soc. 63 (1986) 1062-1066
- (15).- Anonimo.- J. Am. Oil Chemists' Soc. 64 (1987) 805
- (16).- Haumann, B.F.- J. Am. Oil Chemists' Soc. 63 (1986) 278-288
- (17).- Knezevich, M.- J. Am. Oil Chemists' Soc. 64 (1987) 1265

- (18).- Boggs, R.W.- J. Am. Oil Chemists' Soc. 61 (1984) 832-833
- (19).- Toma, R.B., Curtis, D.J. y Sobotor, C.- Food Technol. 42 (1988) 93-95
- (20).- Labarge, R.G.- Food Technol. 42 (1988) 84-90
- (21).- Cowan, J.C.- J. Am. Oil Chemists' Soc. 38 (1961) 130-134
- (22).- Firestone, D.- J. Am. Oil Chemists' Soc. 40 (1963) 247-255
- (23).- Leonard, E.C.- The Dimer Acids. Ed. Humko Sheffield Chemical, Connecticut (1975)
- (24).- Otter, A.M.- Fette Seifen Anstrichmittel 72 (1970) 667-673, 875-883, 1056-1066
- (25).- Paschke, R.F., Peterson, L.E. y Wheeler, D.H.- J. Am. Oil Chemists' Soc. 41 (1964) 723-727
- (26).- Wheeler, D.H. y White, J.- J. Am. Oil Chemists' Soc. 44 (1967) 298-302
- (27).- Cowan, J.C.- J. Am. Oil Chemists' Soc. 39 (1962) 534-545
- (28).- Paschke, R.F., Peterson, L.E., Harrison, S.A. y Wheeler, D.H.- J. Am. Oil Chemists' Soc. 41 (1954) 56-60
- (29).- Michael, W.R.- Lipids 1 (1966) 365-368
- (30).- Alexander, J.C.- J. Am. Oil Chemists' Soc. 55 (1978) 711-717
- (31).- Grandgirard, A., Sebedio, J.L. y Fleury, J.- J. Am. Oil Chemists' Soc. 61 (1984) 1563-1568
- (32).- Damy Zarambaud, A. y Grandgirard, A.- Reprod. Nutr. Dévelop. 121 (1981) 409-419
- (33).- Totani, N., Totani, Y. y Matsuo, N.- J. Am. Oil Chemists' Soc. 54 (1977) 403-407

- (34).- Nawar, W.W.- Chemical Changes in Food during Processing. Ed. Richardson, T. y Finley, J.W.- AVI, Westport, Connecticut (1985) 79-103
- (35).- Nawar, W.W., Bradley, S.J., Lomanno, S.S., Richardson, G.G. y Witeman .- Lipids as a Source of Flavor. Ed. Am. Chemists' Soc. (1978) 42-55
- (36).- Frankel, E.N.- Prog, Lipids Res. 22 (1982) 1-33
- (37).- Frankel, E.N.- Flavor Chemistry of Fats and Oils. Ed. Min, D.B.y Smouse, T.H.- Am. Oil Chemists' Soc. (1985) 1-37
- (38).- Nawar, W.W.- Journal Chem. Educ. 61 (1984) 299-303
- (39).- Miyashita, K., Fujimoto, K. y Kaneda, T.- Agric. Biol. Chem. 46 (1982) 2293-2297
- (40).- Paulose, M.M. y Chang, S.S.- J. Am. Oil Chemists' Soc. 50 (1973) 147-154
- (41).- Ottaviani, P., Graille, J., Perfetti, P. y Nudet, M.- Chem. Phys. Lipids 24 (1979) 57-77
- (42).- Chang, S.S. y Peterson, R.J.- J. Am. Oil Chemists' Soc. 55 (1978) 718-727
- (43).- Forss, D.- Prog. Chem. Fats and Other Lipids 13 (1972) 177-258
- (44).- Frankel, E.N., Neff, W.E. y Selke, E.- Lipids 16 (1981) 279-285
- (45).- Peers, K.E. y Swoboda, P.A.T.- J. Sci. Food Agric. 30 (1979) 876-880
- (46).- Selke, E. y Rohwedder, W.K.- J. Am. Oil Chemists' Soc. 60 (1983) 1853-1858
- (47).- Dobarganes, M.C., Ríos, J.J. y Pérez-Camino, M.C.- Grasas y Aceites 37 (1986) 61-67

- (48).- Fritsh, C.W., Egberg, D.E. y Magnuson, J.S.- J. Am. Oil Chemists' Soc. 56 (1979) 746-750
- (49).- Gere, A.- Fette Seifen Anstrichmittel 85 (1983) 111-117
- ((50).- Gere, A.- Fette Seifen Anstrichmittel 85 (1983) 18-23
- (51).- Weiss, J.J.- Food Oils and Their Uses.- Ed. AVI.- Westport, USA (1970)
- (52).- Pokorny, J.- Riv. Ital. Sostanze Grasse 54 (1977) 389-393
- (53).- Pokorny, J.- Riv. Ital. Sostanze Grasse 57 (1980) 222-225
- (54).- Sims, R.J. y Fioriti, J.A.- J. Am. Oil Chemists' Soc. (1975) 144-147
- (55).- Cheftel, J.-Cl.- Introducción a la Bioquímica y Tecnología de Alimentos.- Ed. Acribia.- Zaragoza (1976)
- (56).- Lillard, D.A.- Journal of Food Protection 46 (1983) 61-67
- (57).- Pokorny, J.- Rev. Franç. Corps Gras 28 (1981) 151-159
- (59).- Huang, A.S., Hsieh, O.A.L., Huang, C.L. y Chang, S.S.- J. Am. Oil Chemists' Soc. 58 (1981) 997-1001
- (60).- Morrison, W.H. y Robertson, J.A.- J. Am. Oil Chemists' Soc. 55 (1978) 451-453
- (61).- Plessis, L.M. y Niekerk, P.J.- J. Am. Oil Chemists' Soc. 58 (1981) 575-578
- (62).- Sulthana, S.N. y Sen D.P. - J. Food Technol. 16 (1979) 208-213
- (63).- Gasparoli, A. y Fedelli, E.- Riv. Ital. Sostanze Grasse 57 (1980) 235-239
- (64).- Gere, A.- Nahrung 26 (1982) 923-932
- (65).- Paradis, A.J. y Nawar, W.W.- J. Food Sci. 46 (1981) 449-451
- (66).- Sanelli, B.- Riv. Ital. Sostanze Grasse 56 (1979) 229-234

- (67).- Urakami, C., Doi, H., Toriyama, S., Asamo, Y. y Oka, S.- J. Am. Oil Chemists' Soc. 53 (1976) 764-772
- (68).- Odumossu, O.T., Sinha, J. y Hudson, B.J.F.- J. Sci. Food Agric. 30 (1979) 515-520
- (69).- Pardum, H., Blass, J. y Kroll, E.- Fette Seifen Anstrichmittel 75 (1974) 97-104 y 151-158
- (70).- Waltking, A.E. y Zmachinsky, H.- J. Am. Oil Chemists' Soc. 47 (1970) 530-534
- (71).- Croon, L.B., Rogstad, A., Leth, T. y Kiutamo, T.- Fette Seifen Anstrichmittel 87 (1986) 87-91
- (72).- Smith, L.M., Clifford, A.J., Hamblin, C.L. y Creveling, R.K.- J. Am. Oil Chemists' Soc. 63 (1986) 1017-1023
- (73).- Pérez-Camino, M.C., Márquez-Ruiz, G., Salgado, A. y Dobarganes, M.C.- Grasas y Aceites 39 (1988) 72-76
- (74).- Gutierrez Gonzalez-Quijano, R. y Dobarganes, M.C.- Frying of Food.- Ed. Varela, G., Bender, A.E. y Morton, I.D.- V.C.H.- Chichester, England (1988) 141-154
- (75).- Aitzetmuller, K.- J. Chromatogr. 79 (1973) 329-334
- (76).- Aitzetmuller, K.- J. Chromatogr. 83 (1973) 461-469
- (77).- Aitzetmuller, K. y Guhr, G.- Fette Seifen Anstrichmittel 78 (1976) 83-88
- (78).- Aitzetmuller, K.- Chemistry and Industry (1988) 452-465
- (79).- Billek, G., Guhr, G. y Waibel, J.- J. Am. Oil Chemists' Soc. 55 (1978) 728-733
- (80).- Gertz, Ch.- Fette Seifen Anstrichmittel 81 (1979) 520-524
- (81).- Guhr, G. y Waibel, J.- Fette Seifen Anstrichmittel 81 (1979) 511-519

- (82).- Sen Gupta, Von A.K.- Fette Seifen Anstrichmittel 78 (1976)
111-118
- (83).- Guillaumin, R.- Rev. Franc. Corps Gras 20 (1973) 285-289
- (84).- Waliking, A.E.- J. Assoc. Off. Anal. Chem. 58 (1975) 898-901
- (85).- Dobarganes, M.C., Pérez-Camino, M.C., Gutiérrez González-Quijano, R.- Grasas y Aceites 35 (1984) 172-177
- (86).- Gente, M. y Guillaumin, R.- Rev. Franc. Corps Gras 24 (1977)
211-218
- (87).- Gere, A., Gertz, Ch. y Morin, O.- Rev. Franc. Corps Gras 31 (1984)
341-346
- (88).- Potteau, B., Lhuissier, M., Leclerc, J., Custot, Mezonnet, R. y Cluzan, R.- Rev. Franc. Corps Gras 17 (1970) 143-153
- (89).- Meltzer, J.E., Frankel, E.N., Bessler, T.R. y Perkins, E.G.- J. Am. Oil Chemists' Soc. 58 (1981) 779-784
- (90).- Grandgirard, A. y Julliard, F.- Rev. Franc. Corps Gras 30 (1983)
123-128
- (91).- Sebedio, J.L., Prevost, J. y Grandgirard, A.- J. Am. Oil Chemists' Soc. 64 (1987) 1026-1032
- (92).- Rojo, J.A. y Perkins, E.G.- J. Am. Oil Chemists' Soc. 64 (1987)
414-421
- (93).- Gomes, T.- Riv. Ital. Sostanze Grasse 55 (1983) 77-80
- (94).- Perkins, E.G. y Iwaoka, W.T.- J. Am. Oil Chemists' Soc. 50 (1973)
44-49
- (95).- Waliking, A.E., Seery, W.E. y Bleffert, G.W.- J. Am. Oil Chemists' Soc. 52 (1975) 96-100
- (96).- Perrin, J.L., Redero, F. y Prevot, A.- Rev. Franc. Corps Gras 31
(1984) 131

- (97).- Christopoulou, C.N. y Perkins, E.G.- J. Am. Oil Chemists' Soc. 63 (1986) 679
- (98).- Inoue, H., Konishi, K. y Taniguchi, N.- J. Chromatog. 47 (1970) 348-354
- (99).- Paradis, A.J. y Nawar, W.W.- J. Am. Oil Chemists' Soc. 58 (1981) 635-638
- (100).- Nelson, J.P. y Milun, A.J.- J. Am. Oil Chemists' Soc. 51 (1974) 81-83
- (101).- Dobarganes, M.C., Pérez-Camino, M.C. y Ríos, J.J.- Grasas y Aceites 35 (1984) 351-357
- (102).- Privett, O.S.- J. Am. Oil Chemists' Soc. 36 (1959) 507-512
- (103).- Quillen, T.Mc. y Woodward, F.N.- J. Oil and Colour Chemists' Assoc. 23 (1940) 8
- (104).- Bernstein, I.M.- J. Phys. and Colloid Chem. 52 (1948) 613
- (105).- Bernstein, I.M.- J. Oil and Colour Chemists' Assoc. 32 (1949) 447
- (106).- Walker, F.T., Mackay, T. y Taylor, K.B.- J. Oil and Colour Chemists' Assoc. 36 (1953) 667
- (107).- Boelhower, C., Knegtel, J. Th. y Tels, M.- Fette Seifen Anstrichmittel 69 (1967) 432-436
- (108).- Firestone, D., Nesheim, S. y Horwitz, W.- J. Am. Oil Chemists' Soc. 44 (1961) 465-474
- (109).- Perkins, E.G., Taubold, R. y Hsich, A.- J. Am. Oil Chemists' Soc. 50 (1973) 223-225
- (110).- Dobarganes, M.C. y Pérez-Camino, M.C.- J. Am. Oil Chemists' Soc. 65 (1988) 101-105
- (111).- Potteau, B. y Causeret, J.- Rev. Franc. Corps Gras 18 (1971) 591-604

- (112).- Perkins, E.G.- Rev. Franc. Corps Gras 23 (1976) 257-262 y 313-322
- (113).- Grandgirard, A.- Ann. Nutr. Alim. 34 (1980) 377-388
- (114).- Causeret, J.- Cahier Nutr. Diet. (1982) 17 19-33
- (115).- Ruiz-Gutiérrez, V.- Grasas y Aceites 38 (1987) 326-335
- (116).- Kaunitz, H., Slanetz, C.A. y Johnson, R.E.- J. Nutr. (1955) 55 577-587
- (117).- Kaunitz, H., Slanetz, C.A., Johnson, R.E., Knight, H.B., Saunders, D.H. y Swern, D.- J. Am. Oil Chemists' Soc. 33 (1956) 630-634
- (118).- Kaunitz, H., Slanetz, C.A., Johnson, R.E., Guilmain, J., Knight, H.B., Saunders, D.H. y Swern, D.- J. Nutr. 60 (1956) 237-244
- (119).- Kaunitz, H., Slanetz, C.A., Johnson, R.E., Knight, H.B., Koos, R.E. y Swern, D.- J. Am. Oil Chemists' Soc. 36 (1959) 611-615
- (120).- Kaunitz, H., Johnson, R.E. y Pegus, L.- J. Am. Oil Chemists' Soc. 42 (1965) 770-773
- (121).- Kaunitz, H., Johnson, R.E. y Pegus, L.- Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 123 (1966) 204
- (122).- Perkins, E.G. y Kummerow, F.A.- J. Am. Oil Chemists' Soc. 36 (1958) 371-375
- (123).- Johnson, O.C., Perkins, E.G., Sugai, M. y Kummerow, F.A.- J. Am. Oil Chemists' Soc. 34 (1957) 594-597
- (124).- Keane, K.W., Jacobson, G.A. y Krieger, G.H.- J. Nutr. 68 (1959) 57-74
- (125).- Perkins, E.G. y Kummerow, F.A.- J. Nutr. 68 (1959) 101-108
- (126).- Raulin, J. y Petit, J.- Arch. Sci. Physiol. 16 (1962) 77-87
- (127).- Raulin, J. y Terroine, T.- Arch. Sci. Physilo. 16 (1962) 89-96

- (128).- Crampton, E.W., Common, R.H., Farmer, F.A., Berryhill, F.M. y Wiseblatt, L.- J. Nutr. 44 (1951) 177-189
- (129).- Crampton, E.W., Common, R.H., Farmer, F.A., Wells, A.F. y Crawford, D.- J. Nutr, 49 (1953) 333-346
- (130).- Crampton, E.W., Common, R.H., Pritchard, E.T. y Farmer, F.A.- J. Nutr. 60 (1956) 13-24
- (131).- Potteau, B.- Nutr. Alim. 30 (1976) 67-88
- (132).- Potteau, B.- Nutr. Alim. 30 (1976) 89-93
- (133).- Potteau, B. y Grandgirard, A.- Bioch. Biophys. 14 (1974) 855-859
- (134).- Iwaoka, W.T. y Perkins, E.G.- J. Am. Oil Chemists' Soc. 55 (1978) 734-738
- (135).- Grandgirard, A.- Ann. Biol. anim., Bioch. Biophys. 18 (1978) 287-294
- (136).- Ramel, P., Lanteaume, M.T., Le Clerc, A.M. y Rannaud, J.- Rev. Franç. Corps Gras 14 (1967) 505-514
- (137).- Poling, C.E., Eagle, E., Rice, E.E., Durand, A.M.A. y Fisher, M.- Lipids 5 (1970) 128-136
- (138).- Ruiz-Gutiérrez, V., Sanz, P., Dominguez, C., Gutiérrez González-Quijano, R. y Repetto, M.- Rev. Tox. 2 (1985) 149-156
- (139).- Sanz, P., Ruiz-Gutiérrez, V., Rodríguez-Vicente, M.C., Villar, P., Gutiérrez González-Quijano, R. y Repetto, M.- Rev. Tox. 1 (1984) 135-146
- (140).- Rodríguez-Consuegra, M.A., Ruiz-Gutiérrez, V., Sanz, P., Gutiérrez González-Quijano, R. y Repetto, M.- Rev. Tox. 2 (1985) 149-156
- (141).- Binet, L. y Wellers, G.- Ann. Nutr. Alim. 20 (1966) 25-31
- (142).- Michael, W.R., Alexander, J.C. y Artman, N.R.- Lipids 1 (1966) 353-358

- (143).- Michael, W.R.- *Lipids* 1 (1966) 359-364 y 365-368
- (144).- Perkins, E.G. y Taubold, R.- *J. Am. Oil Chemists' Soc.* 55 (1978) 632-634
- (145).- Billek, G. y Rost, H.E.- *Fette Seifen Anstrichmittel* 76 (1974) 436-439
- (146).- Shue, G.M., Douglass, C.D., Firestone, D., Friedman, L. y Sage, J.S.- *J. Nutr.* 94 (1968) 171-177
- (147).- Le Floch, E., Acker, P., Ramel, P., Lanteaume, M.Th. y Le Clerc, A.M.- *Ann. Nutr. Alim.* 22 (1968) 249-265
- (148).- Alfin-Slater, R., Morris, R.B., Aftergood, L. y Melnick, D.- *J. Am. Oil Chemists' Soc.* 46 (1969) 657-661
- (149).- Potteau, B., Grandgirard, A., Lhuissier, M. y Causeret, J.- *Biblhca Nutr. Dieta* 25 (1977) 122-133
- (150).- Billek, G.- *The Role of Fats in Human Nutrition.*- Ed. Padley, F.B. y Podmore, J.- Ellis Horwood.- Chichester, England (1985) 163-171
- (151).- Causeret, J., Potteau, B. y Grandgirard, A.- *Ann. Nutr. Alim.* 60 (1978) 483-497
- (152).- Lang, K.- *Fette Seifen Anstrichmittel* 75 (1973) 73-76
- (153).- Rodríguez, A., Cuesta, C., Sanchez-Muniz, F.J. y Varela, G.- *Grasas y Aceites* 35 (1984) 22-28
- (154).- Nolen, G.A., Alexander, J.C. y Artman, N.R.- *J. Nutr.* 93 (1967) 337
- (155).- Billek, G. y Guhr, G.- *Ernaehrung/Nutrition* 3 (1979) 323-379
- (156).- Billek, G.- *Nutr. Metabol.* 24 (1979) 200
- (157).- Billek, G., Guhr, G. y Sterner, W.- *Fette Seifen Anstrichmittel* 81 (1979) 562

- (158).- Saldeen, T. y Linder, E.- Acta Path. 49 (1961) 433-437
- (159).- Bollman, J.L., Cain, J.C. y Grindlay, J.H.- J. Lab. Clin. Med. 33 (1948) 1349-1352
- (160).- Risser, N., Kummerow, F.A. y Perkins, E.G.- Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 121 (1966) 294-298
- (161).- Govind Rao, M.K., Risser, N. y Perkins, E.G.- Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 131 (1969) 1369-1372
- (162).- Perkins, E.G., Vachha, S.M. y Kummerow, F.A.- J.Nutr. 100 (1970) 725-731
- (163).- Hsieh, A. y Perkins, E.G.- Lipids 11 (1976) 763-768
- (164).- Hsieh, A. y Perkins, E.G.- Rev. Franc. Corps Gras 24 (1977) 19-25
- (165).- Savary, P. y Constantin, M.J.- Biochim. Biophys. Acta 218 (1970) 195
- (166).- Sarda, L. y Desnuelle, P.- Biochim. Biophys. Acta 30 (1958) 513
- (167).- Brockerhoff, H.- Biochim. Biophys. Acta 159 (1968) 296
- (168).- Savary, P.- Biochim. Biophys. Acta 270 (1972) 463
- (169).- Combe, N., Constantin, M.J. y Entressangles, B.- Rev. Franç. Corps Gras 25 (1978) 27-28
- (170).- Combe, N., Constantin, M.J. Y Entressangles, B.- Lipids 16 (1981) 9-14
- (171).- Cuesta, C., Sanchez-Muniz, F.J. y Varela, G.- Frying of Food.- Ed. Varela, G., Bender, A.E. y Morton, I.D.- Ellis Horwood.- Chichester, England (1988) 112-128
- (172).- Bottino, N.R.- J. Am. Oil Chemists' Soc. 39 (1962) 25
- (173).- Friedman, L., Herwitz, W., Shue, G.M. y Firestone, D.- J. Nutr. 73 (1961) 85

- (174).- Ohfuji, T., Iwamoto, S. y Kaneda, T.- Yukagaku 19 (1970) 887
- (175).- Kajimoto, G. y Mukai, K.- Yukagaku 19 (1970) 66
- (176).- Lassen, S., Bacon, E.K. y Dunn, H.J.- Arch. Biochem. Biophys. 23 (1949) 1
- (177).- Perrin, J.L., Perfetti, P., Dimitriades, C. y Naudet, M.- Rev. Franç. Corps Gras 32 (1985) 151-158
- (178).- Dobarganes, M.C. y Pérez-Camino, M.C.- Rev. Franç. Corps Gras 35 (1988) 67-70
- (179).- Sotirhos, N., Ho C.T. y Chang, S.S.- Fette Seifen Anstrichmittel 88 (1986) 45
- (180).- White, P.J. y Wang, Y.C.- J. Am. Oil Chemists' Soc. 63 (1986) 914
- (181).- Waliking, A.E. y Wessels, H.- J. Assoc. Off. Anal. Chem. 64 (1981) 1329-1330
- (182).- NORMA UNE 55-011.- Determinación de la acidez libre
- (183).- NORMA UNE 55-023-73.- Índice de peróxidos
- (184).- NORMA UNE 55-116-75.- Determinación de la Estabilidad (A.O.M.)
- (185).- NORMA UNE 55-037-73.- Determinación de ácidos grasos por cromatografía gaseosa
- (186).- Toullec, R., Flancy, J. y Rigaud, J.- Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys. 8 (1968) 281-289
- (187).- Metcalfe, L.D. y Schmitz, A.A.- Anal. Chem. 33 (1961) 363-366
- (188).- Ackman, R.G.- Prog. Chem. Fats Other Lipids 12 (1972) 165-284
- (189).- Quintao, E., Grundy, S.M. y Ahrens, E. H.- J. Lipid Res. 12 (1971) 221

- (190).- Abrahamsson, S., Stenhagen, S.S. y Stenhagen, E.- Prog. Chem. Fats and Other Lipids 7 (1964) 31-33
- (191).- Heefner, D.L. y Claus, G.- J. Bacteriol. 134 (1978) 38
- (192).- Asselineau, C. y Asselineau, J.- Gas Chromatography-Mass spectrometry. Applications in Microbiology.- Ed. Odham, G., Larsson, L. y Mårdh, P.-A.- Plenum Press, New York and London (1984) 57-94
- (193).- Hofmann, A.F. y Borgström, B.- Proc. of Am. Soc. for Exp. Biology 21 (1962) 43-50
- (194).- Freeman, C.P.- Fats in Animal Nutrition.- Ed. Wiseman, J.- Proceeding of the 37th Nottingham Easter School.- London, UK (1984) 105-122
- (195).- Borgström, B.- Scand. J. Gastroenterol. 20 (1985) 384-394
- (196).- Long, T.T., Jakoi, L., Stevens, R. y Quarfordt, S.- Journal of Lipid Research 19 (1978) 872-878
- (197).- Miettinen, T.A., Proia, A. y Mc Namara, D.J.- Journal of Lipid Research 22 (1981) 485-495
- (198).- Hoet, P.P., Joosens, J.V., Evrard, E., Eyssen, H. y De Somer, P.- Biochemical Problems of Lipid.- Ed. Frazer, A.C.- Elsevier Publishing Company.- Amsterdam, London, New York (1963) 73-83
- (199).- Mc Namara, D.J., Proia, A. y Miettinen, T.A.- Journal of Lipid Research, 22 (1981) 474-484
- (200).- Eneroth, P.K., Hellström y Ryhage, R.- J. Lipid Res. (1964) 5 245-262
- (201).- Thomson, A.B.R.- Disturbances in Lipid and Lipoprotein Metabolism Ed. Dietschy, J.M., Gotto, A.M. y Ontko, J.A.- Am. Physiol. Soc.- Bethesda (1978) 29
- (202).- Corey-Gibson, J.- Lipid Research Methodology.- Ed. Sturg, J.A.- New York (1984) 157-190
- (203).- James, A.T., Webb, J.P.W. y Kellock, T.D.- Biochem. J. 76 (1961) 333

- (204).- Wyatt, G.M., Horn, N., Gee, J.M. y Johnson, I.T.- British Journal of Nutrition 60 (1988) 197-207
- (205).- Entressangles, S., Pasero, L., Savary, P., Sarda, L. y Desnuelle, P.- The enzymes of Lipid Metabolism.- Ed. Desnuelle, P.- Pergamon Press.- London (1961) 22
- (206).- Morris, L.J. y Hall, S.W.- Lipids 1 (1966) 188-196
- (207).- Christie, W.W.- Biochem. Biophys. Acta 187 (1969) 1-5
- (208).- Desnuelle, P.- Biochimie 53 (1971) 841
- (209).- Derbesy, M. y Naudet, M.- Rev. Franc. Corps Gras. 19 (1972) 225-232
- (210).- Savary, P.- Biochem. Biophys. Acta 270 (1972) 463-471
- (211).- Brockerhoff, H. y Jensen, R.G.- Lipolytic Enzymes.- Ed. Academic Press (1974)
- (212).- Yoshida, H. y Alexander, J.C.- Lipids 18 (1983) 402-407
- (213).- Chang, S.S. y Kummerow, F.A.- J. Am. Oil Chemists' Soc. 30 (1953) 403-407
- (214).- Williamson, L.- J. Appl. Chem. 3 (1953) 301
- (215).- Paulose, M. y Chang, S.S.- J. Am. Oil Chemists' Soc. 50 (1973) 147-154

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes
en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de
D.^a Gloria Márquez Ruiz
titulada "Evaluación Analítica y Nutricional de Grasas
Comestibles Termoxidadas"

acordó otorgarle la calificación de Apto Cum Laude

Sevilla, 21 de Abril 1989

El Vocal,



El Presidente

El Vocal,

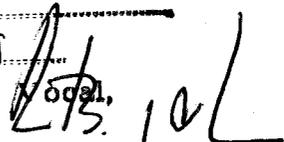


El Secretario,



Manuel Manera

El Vocal,



El Doctorado,



Gloria Márquez