



Universidad de Navarra

**MEMORIA PRESENTADA PARA ASPIRAR AL TÍTULO DE
GRADO DE NUTRICIÓN HUMANA Y DIETÉTICA**

TÍTULO DE LA MEMORIA:

**ESTUDIO COMPARATIVO DE LA OXIDACIÓN EN MATRICES LIPÍDICAS
DE DISTINTA NATURALEZA:
APLICACIÓN DE TBA Y COMPUESTOS VOLÁTILES**

Firmado:

Mercedes Rubio Hernández

Pamplona, a 5 de Mayo de 2020

ÍNDICE

RESUMEN	2
ABSTRACT	2
ABREVIATURAS	3
INTRODUCCIÓN	4
IMPORTANCIA DE LA OXIDACIÓN LIPÍDICA EN LOS ALIMENTOS	4
EVALUACIÓN DE LA OXIDACIÓN LIPÍDICA	6
MATERIAL Y MÉTODOS	8
MATERIAL	8
MÉTODOS	8
Oxidación acelerada	8
Determinación de compuestos volátiles por cromatografía de gases-masas.....	9
Método de TBA por espectrofotometría	10
RESULTADOS	12
DISCUSIÓN	18
CONCLUSIONES	22
BIBLIOGRAFÍA	23

RESUMEN

Fundamento. La oxidación lipídica es un factor importante en el mundo alimentario, ya que afecta tanto al aspecto sensorial como a la salud. El proceso de autooxidación es el más frecuente y en él se generan productos primarios inestables (hidroperóxidos), que dan lugar a los secundarios entre los que destacan los aldehídos. Al ser un proceso dinámico, su evaluación analítica es difícil.

El objetivo del trabajo fue conocer la relación entre 2 métodos de evaluación: la determinación de volátiles (HS-SPME-GC-MS) y la absorbancia de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBA) a 532 nm.

Material y métodos. Se han oxidado de forma acelerada muestras de aceite de oliva y de girasol a diferentes tiempos (0,12, 24 horas). Se han identificado los compuestos volátiles resultantes y se ha medido la absorbancia entre 300-600 nm en cada muestra. También se han sometido patrones de aldehídos al ensayo de TBA.

Resultados. En la muestra de aceite de oliva, se encontró alta correlación entre la absorbancia a 532 nm y los volátiles considerados como destacados, por ser típicos de oxidación y modificarse con el tiempo. Sin embargo, en la muestra de aceite de girasol, la correlación fue más baja.

Conclusión. El ensayo de TBA es un método muy utilizado por su sencillez, pero según la muestra y el estado de oxidación, puede infraestimar la oxidación, especialmente cuando se forman aldehídos que no reaccionan con el TBA.

Palabras clave: Oxidación lipídica, Extracción en fase sólida (SPME), Cromatografía de gases – espectrometría de masas (GC-MS), Ensayo del ácido tiobarbitúrico (TBA), aldehídos volátiles.

ABSTRACT

Fundament. Lipid oxidation is an important factor in food industry because it affects organoleptic properties and health. Autooxidation is the most common reaction. This reaction produces primary compounds (hidroperoxides) which transform quickly into secondary products. Aldehydes are the main group of these products. And as it is a dynamic process, its analytical evaluation is more difficult.

The aim of this work is to know if there was correlation between 2 evaluation methods: determination of volatile compounds (HS-SPME-GC-MS) and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) at 532 nm.

Methods and materials. Olive oil and sunflower oil samples have been oxidized at accelerated conditions at different times (0, 12, 24 hours). For each sample volatile compounds have been identified and absorbance has been measured at 300-600 nm range. Also, aldehyde standards have been tested in TBARS assay.

Results. Correlation has been observed in olive oil sample between 532 nm absorbance and highlighted volatile compounds which have been modified through oxidation time. On the contrary, correlation in sunflower oil was lower.

Conclusion. TBA assay is the most popular method to measure lipid oxidation, but it does not mean it is the best. Depending on the sample and the oxidation status, it can underestimate oxidation, mainly when aldehydes do not react with TBA.

Keywords: Lipid oxidation, Solid phase microextraction (SPME), Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), volatile aldehydes.

ABREVIATURAS

AGP: ácidos grasos poliinsaturados

AGM: ácidos grasos monoinsaturados

AGS: ácidos grasos saturados

HS-SPME: *Head Space-Solid phase microextraction*. Microextracción en fase sólida del espacio de cabeza

GC-MS: *Gas chromatography-Mass Spectrometry*. Cromatografía de gases-espectrometría de masas

MDA: Malondialdehído

TBA: Ácido tiobarbitúrico

AO: Aceite de oliva

AG: Aceite de girasol

TEP: 1-1-3-3-Tetrahidroxipropano

BHT: Butilhidroxitolueno

DVB/CAR/PDMS: *Divinylbenzene/Carboxen/Polydimethylsiloxane*.

IK: Índice de Kovats

AUC: Área bajo la curva

INTRODUCCIÓN

IMPORTANCIA DE LA OXIDACIÓN LIPÍDICA EN LOS ALIMENTOS

La oxidación lipídica es una de las alteraciones más determinantes durante el procesado y conservación de alimentos, ya que afecta significativamente a su vida útil, a sus características organolépticas (como olor o sabor), y también a su valor nutricional. Además, el punto de vista de la salud también debe ser contemplado, ya que puede dar lugar a compuestos de distinta naturaleza, algunos de los cuales pueden contribuir al desarrollo de enfermedades como la arteriosclerosis.

La oxidación lipídica se puede iniciar vía enzimática o no enzimática. El proceso de oxidación depende en gran medida del grado de insaturación de la fracción lipídica del alimento, siendo más rápida e intensa en aceites y grasas insaturados (*Bertolín et al., 2019*). Los alimentos ricos en ácidos grasos poliinsaturados (AGP) son los más sensibles a la oxidación (*Maszevska et al., 2018*), frente a los ácidos grasos monoinsaturados (AGM) y los ácidos grasos saturados (AGS), siendo estos últimos los más resistentes.

La causa principal es la autooxidación no enzimática (*Xu et al., 2018*), que se produce mediante la formación de radicales libres y consta de 3 fases: iniciación, propagación y terminación. Los radicales libres se pueden producir por contacto de un ácido graso con oxígeno (incluso a bajas temperaturas) (*Xu et al., 2018*), humedad, alta temperatura, presencia de iones metálicos oxidantes e incidencia directa de la luz (*Landines Parra & Zambrano Navarrete, 2009*).

Durante el proceso se producen hidroperóxidos, productos primarios e inestables que rápidamente generan productos secundarios de oxidación. Estos productos secundarios tienen, en su mayoría, un bajo umbral de detección y entre ellos se encuentran cetonas, alcoholes, ácidos hidrocarbonados, furanonas, lactonas y, principalmente, aldehídos (Fig 1) (*Navarro-García et al., 2004; Poyato et al., 2014*).

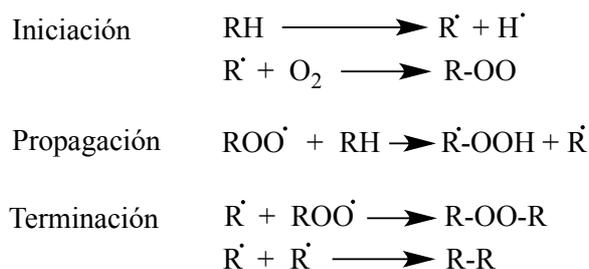


Figura 1. Mecanismo de autooxidación mediante radicales libres.

Los aldehídos generados en la oxidación suelen ser moléculas pequeñas, de bajo peso molecular, por lo que la mayoría son volátiles; de ahí que la oxidación pueda ser percibida sensorialmente mediante el olfato. Debido a esta característica, uno de los métodos de análisis de oxidación propuesto en este trabajo, será el análisis de la fracción volátil mediante la microextracción en fase sólida del espacio de cabeza (HS-SPME) y posterior aplicación de cromatografía de gases masas (GC-MS) para la identificación y cuantificación de los compuestos extraídos.

A continuación, se indica en la Tabla 1 los umbrales de detección de algunos compuestos volátiles y las características sensoriales que presentan. Para la mayoría de los compuestos los umbrales de detección son muy bajos, por lo que es suficiente una pequeña cantidad para su percepción olfativa.

Tabla 1. Compuestos volátiles, umbral de detección y descripción sensorial.

Compuesto	Umbral de detección (ng/L)	Descriptorios sensoriales
PENTANO	638	Disolvente orgánico, acre, aromático
Ácido acético	1384	Vinagre, ácido, acre
1-penten-3-ol	2890	Mantequilla, acre
HEPTANO	378	Insípido
Pentanal	38	Acre, almendrado, malta
(E)-2-pental	1500	Fresa, fruta, tomate, acre, manzana
1-pentanol	3590	Balsámico
1-octeno	1859	Petróleo
Hexanal	51	Hierba, verde, rancio, seboso, graso
(E)-2-octeno	1903	-
(Z)-2-octeno	1903	-
(E)-2-hexenal	174	Seboso, verde
1-hexanol	360	Verde, floral
(E)-2-heptenal	88	Graso, jabón, almendra, aceite
1-octen-3-ona	1	Champiñón, metálico
1-octen-3-ol	32	Champiñón
(Z,E)-2,4-heptadienal	-	Frito
Octanal	9	Graso, jabonoso, verde, aceitoso, fresco
Limoneno	718	Limón, naranja
(E)-2-Octenal	20	Verde, nueces, graso, aceitoso
1-octanol	73	Químico, metálico, quemado
Nonanal	12	Cítrico, verde, graso, aceitoso, jabonoso, seboso, afrutado
(E)-2-nonenal	1	Pepino, verde, seboso, aceitoso
DODECANO	5300	Gasolina
Decanal	4	Floral, piel de naranja, jabonoso, seboso, verde, fresco
(E)-2-decenal	3	Seboso, olor naranja
(E,E)-2,4-decadienal	38	Graso

Modificado de: (Petersen et al., 2012; Xu et al., 2018)

EVALUACIÓN DE LA OXIDACIÓN LIPÍDICA

Dada la inestabilidad de algunos de los compuestos que se generan durante la oxidación lipídica, y la gran cantidad de factores que intervienen en este proceso, su evaluación sigue siendo, hoy en día, un reto. Para la evaluación de la oxidación lipídica se puede recurrir a diferentes métodos: índice de peróxidos, análisis de TBA, cromatografía, quimioluminiscencia, emisión de fluorescencia, espectroscopía Raman, espectroscopía infrarroja o resonancia magnética (*Barriuso et al., 2012*). Cada uno de ellos presenta ciertas ventajas e inconvenientes, y suele ser necesario adaptarlos a los tipos de muestras a analizar.

Uno de los métodos clásicos y más utilizados es la detección de malondialdehído (MDA) mediante la reacción con ácido tiobarbitúrico (TBA). El MDA es un aldehído no volátil, que se genera como producto secundario de oxidación y es el más empleado para su evaluación, por lo que se le considera un biomarcador de oxidación (*Ma et al., 2019; Poyato et al., 2014*).

La determinación de la oxidación mediante TBA es un método fotométrico, cuyas principales desventajas son su baja reproducibilidad y falta de especificidad; pero es sencilla (en cuanto a técnica y equipos), barata y muy útil para el estudio de varias muestras. Actualmente se sigue utilizando en una gran cantidad de tipos de alimentos distintos por todas las ventajas que presenta, pero hay que tener en cuenta las dificultades, principalmente su inespecificidad (*Papastergiadis et al., 2012*).

En el ensayo de TBA se obtienen compuestos coloreados, principalmente rosas, que absorben a 532 nm; pero es posible que, dependiendo de los tipos de muestras analizados se produzcan interferencias por la presencia de otros compuestos coloreados, lo que podría inducir a sobreestimar o infraestimar la oxidación real. Entre ellos se encuentran los aldehídos, que tienen color amarillo y absorben a 455 nm, y los dienales, que tienen color anaranjado y absorben a 495 nm (*Ghani et al., 2017; Poyato et al., 2014; Semeniuc et al., 2016*).

Otro de los métodos es la extracción, detección, identificación y cuantificación de compuestos volátiles resultantes de procesos oxidativos. Cada tipo de ácido graso tiende a dar lugar a un conjunto de compuestos de distinta naturaleza. Por ejemplo, el aceite de oliva contiene alta proporción de ácido oleico, que al oxidarse da lugar a compuestos como heptanal, octanal, nonanal, decanal, (E)-2-decenal y (E)-2-undecenal. Sin embargo, el aceite de girasol tiene mayor proporción de ácido linoleico, dando lugar a compuestos

como hexanal, 2-heptenal, 2-octenal, (E,Z)-2,4-decadienal y (E,E)-2,4-decadienal (Poyato *et al.*, 2014). Para la extracción de los volátiles se pueden emplear distintos métodos, siendo uno de los más utilizados la microextracción en fase sólida del espacio de cabeza (HS-SPME). Es una técnica que no usa disolventes, relativamente rápida, sensible y económica para la preparación de muestras de cromatografía de gases. Y para la posterior separación, identificación y cuantificación de los mismos se aplica la cromatografía de gases masas (GC-MS).

El objetivo de este trabajo fue establecer una correlación entre dos metodologías de evaluación de oxidación lipídica: análisis de compuestos volátiles, medidos por cromatografía de gases (HS-SPME-GC-MS), y la medición de TBA, concluyendo acerca de su idoneidad para ser aplicadas en muestras de distinta naturaleza. En particular, se trabajó con una muestra rica en AGM (aceite de oliva virgen extra) y una muestra rica en AGP (aceite de girasol), sometidos a oxidación inducida por alta temperatura y presencia de metal.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL

Se ha utilizado para la preparación de las muestras aceite de oliva virgen extra (AO) (Urzante S.L., Navarra, España) y aceite refinado de girasol (AG) (Lanisol; EROSKI, S. COOP., Vizcaya, España).

Los patrones metilados (metil-oleato y metil-linoleato) y los patrones de aldehídos (pentanal, hexanal, octanal, (E)-2-octenal, nonanal y (E,E)-2,4-decadienal) fueron obtenidos de Sigma-Aldrich Chemical (Steinheim, Alemania).

El etanol procede de Guinama (Valencia, España), el butilhidroxitolueno (BHT) de Merck (Whitehouse Station, NJ, USA) y el ácido clorhídrico (37%), ácido tricloroacético (TCA), ciclohexanona, sulfato amónico y TEP (1-1-3-3-Tetrahidroxipropano) se obtuvieron de Panreac (Barcelona, España).

MÉTODOS

En este proyecto se trabajó con una muestra de aceite de oliva virgen extra (AO), formado caracterizado por su alto contenido en AGM (67% del total); y una muestra de aceite de girasol (AG), rica en (AGP, fundamentalmente ácido linoleico, con un 58% del total). Cada una de las muestras se sometió al análisis de compuestos volátiles mediante HS-SPME-GC-MS y al ensayo de TBA, antes y después de ser sometida a un proceso de oxidación acelerada durante distintos tiempos.

Asimismo, se sometió a este proceso muestras de ácidos grasos puros (oleico y linoleico metilados) para verificar qué compuestos volátiles se formaban en las condiciones de oxidación utilizadas en este trabajo.

Además, para conocer el comportamiento de los aldehídos resultantes de la oxidación en el ensayo de TBA, se eligieron aldehídos representativos de la oxidación del aceite de oliva y de girasol. Los aldehídos elegidos fueron pentanal, hexanal, octanal, (E)-2-octenal, nonanal y (E,E)-2,4-decadienal.

Oxidación acelerada

Tanto las muestras de aceite como los patrones de ácidos grasos metilados siguen el mismo protocolo. En un vial de vidrio de 10 ml se pesa con precisión 1 g de aceite y se le añaden 0,23 g de virutas de cobre. El vial se sella y se coloca en una placa calefactora (Rotaterm, P Selecta, Barcelona, España) a una temperatura constante de 90°C durante el

tiempo que corresponda (0h, 12h y 24h). Para la detección de los compuestos volátiles, la fibra SPME debe estar 30 minutos como mínimo en el vial. Por ello, las muestras de 0h se colocan en la placa durante 30 minutos con la fibra introducida y en las muestras de 12h y 24h, la fibra se coloca en los últimos 30 minutos de calentamiento.

Una vez cumplido el tiempo de calentamiento, la fibra impregnada con los volátiles es analizada en el GC-MS y el vial con la muestra se enfría y se mantiene en refrigeración (4°C) hasta el análisis de TBA. Las muestras han sido analizadas por duplicado, preparando 2 viales para cada intervalo de tiempo (6 viales para cada aceite).

Para el ensayo de TBA, de cada uno de los viales se preparan 2 tubos de ensayo (12 viales para cada aceite) (Fig 2).

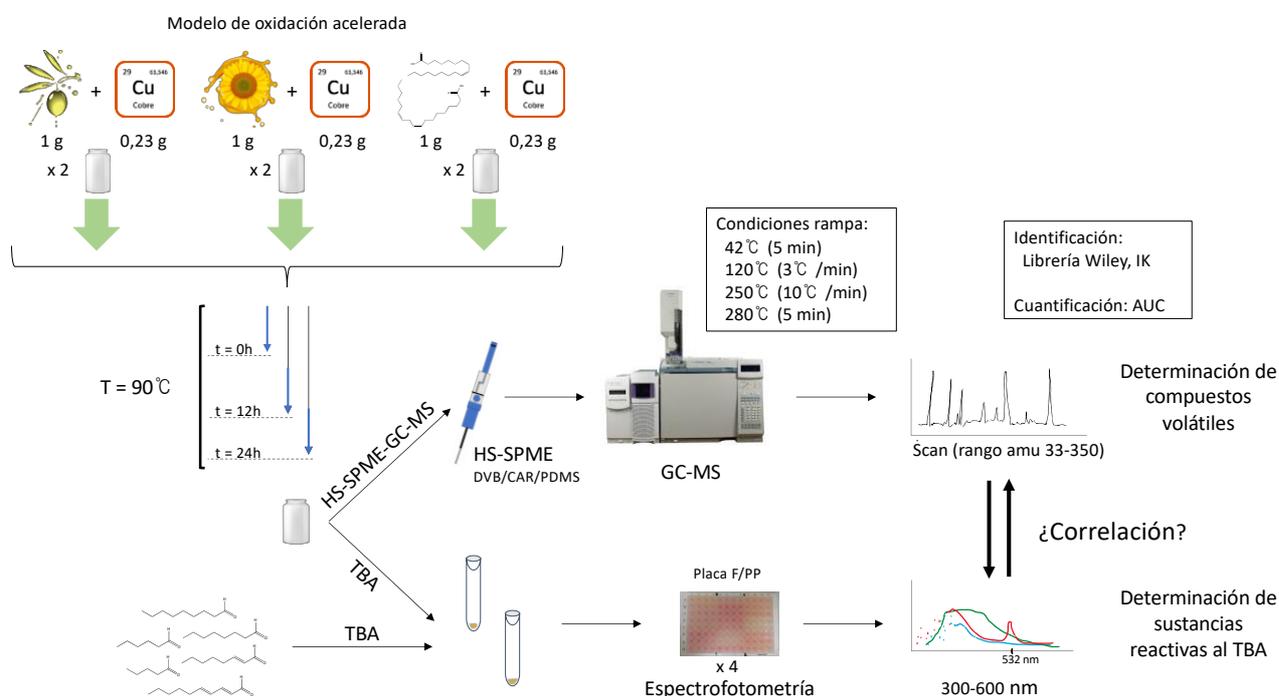


Figura 2. Diseño del experimento. Inicio con oxidación acelerada a distintos tiempos de los aceites y ácidos grasos metilados, posteriormente se realiza la detección de volátiles (HS-SPME-GC-MS) y el ensayo de TBA. Este último en las muestras de aceite y en los patrones de los aldehídos. (Cu: cobre utilizado en la oxidación, IK: Índice de Kovats, AUC: área bajo la curva).

Determinación de compuestos volátiles por cromatografía de gases-masas

La determinación de volátiles en el espacio de cabeza de las muestras se ha realizado mediante el método HS-SPME-GC-MS.

La fibra DVB/CAR/PDMS (Divinylbenzene/Carboxen/Polydimethylsiloxane, 50/30 µm film thickness, Supelco) se limpia previamente durante 30 minutos en el GC (inyector a 270°C). Posteriormente, se introduce en el vial (1g de muestra) mientras está en la placa a 90°C, durante 30 minutos.

Transcurrido ese tiempo, la fibra se inyecta en un cromatógrafo modelo HP 6890 Series (Hewlett Packard), equipado con un HP Mass Selective Detector 5973. Se utilizó una columna de sílica fundida (30 m de longitud x 0,25 mm de diámetro interior x 0,25 µm de recubrimiento, de Agilent Technologies), cubierto con una fase estacionaria no polar (HP-5MS, 5% fenil metil siloxano).

Se establecen las siguientes condiciones de rampa en el horno: temperatura inicial 42°C (durante 5 min); aumenta progresivamente hasta 120°C (3°C/min), después aumenta hasta 250°C (10°C/min) y por último se mantiene en 280°C (durante 5 min).

La temperatura de la fuente de iones y la del detector de masas tetrapolar se establece a 230°C y 170°C, respectivamente. Se utiliza helio como fase móvil (1ml/min) y la temperatura del inyector y del detector se establece a 270°C y 280°C respectivamente.

El espectro de masas se obtiene a 70eV, utilizando el modo scan (rango amu 33-350).

La identificación de los compuestos se realizó mediante el uso de los Índices de Kovats (IK), espectro de masas y comparación con el espectro de masas de una biblioteca comercial (Wiley 275.L, Mass Spectral Database). Los resultados de cuantificación para cada pico se expresaron en unidades de área bajo la curva (AUC) x 10³/g muestra. Además, se calculó también el AUC total resultante de la suma de áreas de aquellos compuestos cuya área se incrementó a lo largo del tiempo de calentamiento.

Método de TBA por espectrofotometría

El protocolo del ensayo de TBA se ha desarrollado en base al método propuesto por *(Tarladgis et al., 1960)*.

Se prepara una disolución (500 ml) de TBA 0,026 M en campana. Para ello se disuelven 1,875g de ácido 2-tiobarbitúrico en 375 mL de ácido tricloroacético (20%) (TCA). Se añaden 12,3 ml de HCl (37%) y se enrasa a 500 mL con agua destilada. Guardar en refrigeración y protegido de la luz.

Para preparar butilhidroxitolueno (BHT), se pesan 0,578 g de BHT y se disuelven en 100 mL de etanol. Se guarda en refrigeración y protegido de la luz.

Previo al ensayo de muestras se prepara una recta de calibrado con TEP (1-1-3-3-Tetrahidroxipropano). Se pesan 0,74 mL de TEP y se enrasa con agua destilada en un matraz de 1L, para obtener una concentración 3x10⁻⁴ M. A partir de esta disolución, se preparan 100 mL de disolución 3x10⁻⁵ M de TEP; a partir de la cual se realizan 6 diluciones patrón para preparar la recta de calibrado (Fig 3).

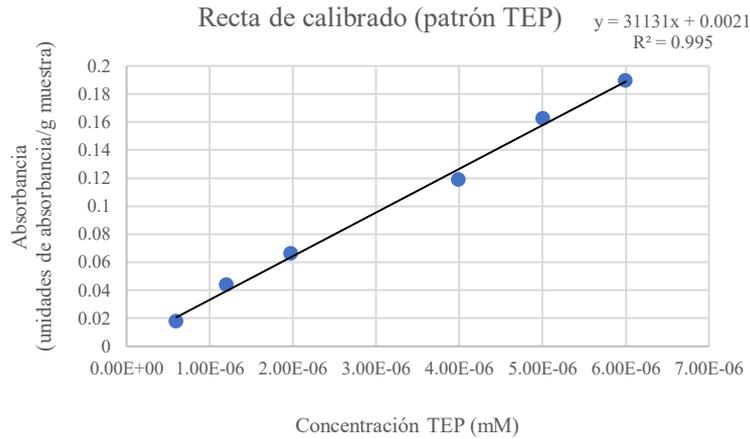


Figura 3. Recta de calibrado, realizada con el patrón TEP (1-1-3-3-Tetrahidroxipropano).

De esta recta, se obtiene la ecuación a partir de la cual se calcularán los meq de MDA a 532 nm:

$$y = 31131x + 0,0021; \quad R^2 = 0,995$$

Además, se han preparado los siguientes patrones de aldehídos: pentanal (0,12 M), hexanal (0,107 M), octanal (0,079 M), (E)-2-octenal (0,06 M), nonanal (0,058 M) y (E,E)-2,4-decadienal (0,085 M). Se ha utilizado etanol 100% como disolvente, en vez de agua destilada, para mejorar su solubilidad (Semeniuc et al., 2016).

Tanto las disoluciones patrón como patrones de aldehídos y muestras se han analizado por duplicado y han seguido el mismo protocolo de TBA.

Para el ensayo de TBA, se añaden 0,5 g de muestra o patrón a un tubo de ensayo de 10 mL. Posteriormente se adiciona agua destilada (0,8 mL), TBA (2 mL) y BHT (20 µL). Se agitan los tubos en el vortex (30 s), se ponen en el baño de agua a 100°C durante 30 min. Se enfrían los tubos durante 15 min. Después se añade ciclohexanona (4 mL), sulfato amónico 4 M (1 mL) y se mezcla en el vortex (30 s). A continuación, se centrifugan los tubos 10 min a 4000 rpm.

Para medir la absorbancia se toman 200 µL del sobrenadante y se mide en el espectrofotómetro en el rango 300-600 nm (FLUOStarOmega spectrofluorometric analyzer, BMG Labtechnologies, Offenburg, Germany). El análisis se hace por cuadruplicado. El espectro se mide con una resolución de 2 nm. Los resultados se expresan en unidades de absorbancia corregidas por peso de muestra (unidades de absorbancia/g muestra) y en miliequivalentes de MDA por gramos de muestra (meq MDA/g muestra) a 532 nm. Las placas de 96 pocillos utilizadas son de tipo F/PP.

RESULTADOS

A continuación se presentan los datos obtenidos del ensayo HS-SPME-GC-MS:

En las Tablas 2 y 3 (muestra de AO y AG respectivamente), se muestra para cada compuesto obtenido su Índice de Kovats (IK), su valor de área bajo la curva (AUC) para cada uno de los tiempos ensayados y el valor de AUC para el patrón (ác. oleico y ácido linoleico) a las 24h.

En las Figuras 4 y 5 (muestra de AO y AG respectivamente), se presenta gráficamente la evolución de los picos indicados en las Tablas 2 y 3.

Tabla 2. Muestra de AO (Aceite de Oliva). Índice de Kovats (IK), media de las AUC (área bajo la curva) de los picos de compuestos volátiles obtenidos por HS-SPME-GC-MS a los distintos tiempos y del patrón (ác. oleico) a las 24 horas. Los resultados se expresan en unidades de área x 10³/g muestra.

Compuesto	IK	MEDIA AUC AO 0h	MEDIA AUC AO 12h	MEDIA AUC AO 24h	ÁC. OLEICO 24h
Ácido acético	632	31920	21573	23287	
3-metil-butanal	660	687	1185	1405	
1-penten-3-ol	679	1467	1605	2115	
1-penten-3-ona	684	2384	2616	2777	
Ciclopentanol	692		4948	5847	
(E)-2-pentenal	748			2725	
(Z)-2-penten-1-ol	767	2358	2368	2052	
Hexanal	804	13173	12830	13851	3632
(E)-2-hexenal	853	114029	106266	104106	
(E)-3-hexen-1-ol	855		23532		
(Z)-3-hexen-1-ol	857	25939	26518	26261	
(E)-2-hexen-1-ol	867	18442	16885	16466	
1-hexanol	869	16663	15457	15120	
2- etil-butanal	898		5031	4389	
(E)-2-heptenal	956	1479	9770	19673	
1-octen-3-ona	977		910	2488	
1-octen-3-ol	981	208	1593	2938	
(Z,E)-2,4-heptadienal	996			10318	
Octanal	1002	603	4258	16034	56301
Acetato 3-hexen-1-ol	1009	56262	51920	47857	
N-hexyl acetato	1015	9161	10121	11949	
(E)-beta-ocimeno	1048	3840	3225	2685	
(E)-2-Octenal	1056		1035	3283	
(E)-2-undecen-1-ol	1067			812	
1-octanol	1070	858	2329	4830	23000
Nonanal	1104	4676	10955	26858	119607
Benceno etanol	1109	3093	2805	2952	

(E)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno	1116	8600	7999	7593	
(E)-2-nonenal	1159		414	1196	13047
DODECANO	1199	801	1667	2065	9945
Decanal	1204				2225
Metil ciclododecano	1206	17690	16939	16196	
(E)-2-decenal	1260	691	4061	16450	94294
Alfa-copaeno	1379	1946	2262	2310	
(E)-alfa-bergamonteno	1391	77	197		
TETRADECANO	1400	299	367	515	
Alfa-muuroleno	1502	288	394	286	

Evolución de volátiles en AO

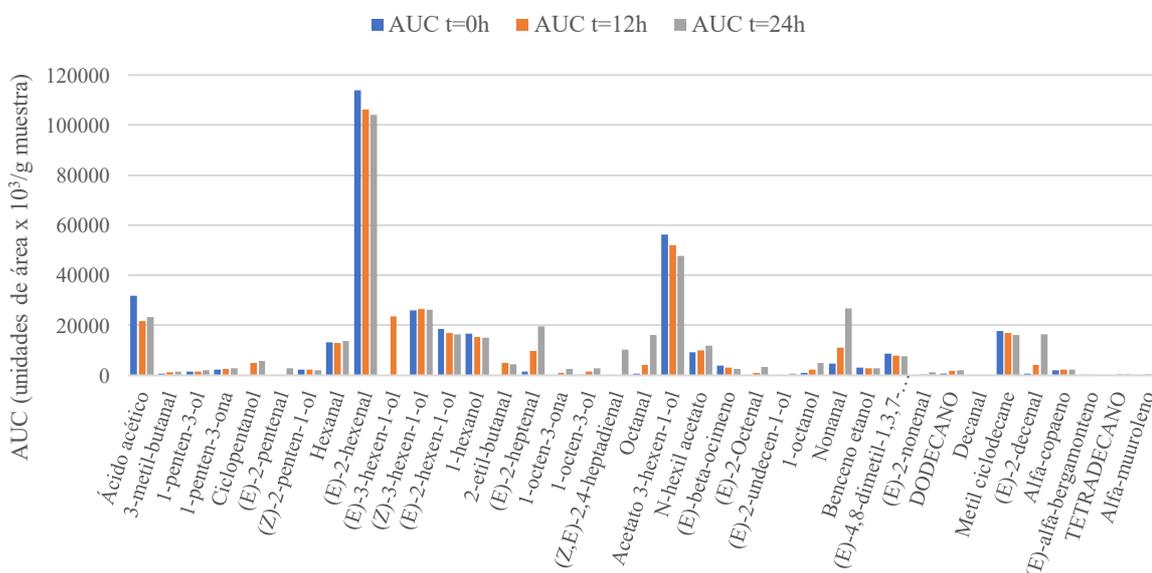


Figura 4. Muestra de AO (Aceite de oliva). Evolución de los compuestos volátiles de la muestra a los diferentes tiempos (0h, 12h, 24h), expresado en función de AUC (unidades de área x 10³/g muestra).

Tabla 3. Muestra de AG (Aceite de girasol). Índice de Kovats (IK), media de las AUC (área bajo la curva) de los picos de compuestos volátiles obtenidos por HS-SPME-GC-MS a los distintos tiempos y del patrón (ác. linoleico) a las 24 horas. Los resultados se expresan en unidades de área x 10³/g muestra.

Compuesto	IK	MEDIA AUC AG 0h	MEDIA AUC AG 12h	MEDIA AUC AG 24h	ÁC. LINOLEICO 24h
PENTANO		1255	31765	41626	46494
Ácido acético	632	1033	10780	8587	
HEPTANO	700	1507			9504
Pentanal	701		9802	9187	
1-pentanol	765		4905	3978	
1-octeno	793	326			
Hexanal	804	5964	53588	54073	34054

(E)-2-octeno	809	1247			
(Z)-2-octeno	815	505			
(E)-2-hexenal	853		14453	19452	11889
Alfa-pineno	929	25488			
(E)-2-heptenal	956	6322	186047	174420	93741
Sabineno	970	3358			
1-octen-3-ona	977	324	9263	10471	
1-octen-3-ol	981	770	68036	63574	21357
Limoneno	1026	1978			
Butilbenceno	1051	979			
(E)-2-Octenal	1056		22328	34320	25429
Gamma-terpineno	1057	1050			
Nonanal	1104		11077	12549	
(E)-2-decenal	1260		9980	10854	
(E,Z)-2,4-decadienal	1292	5779	55948	105155	238770
(E,E)-2,4-decadienal	1317	11573	147057	282207	631980

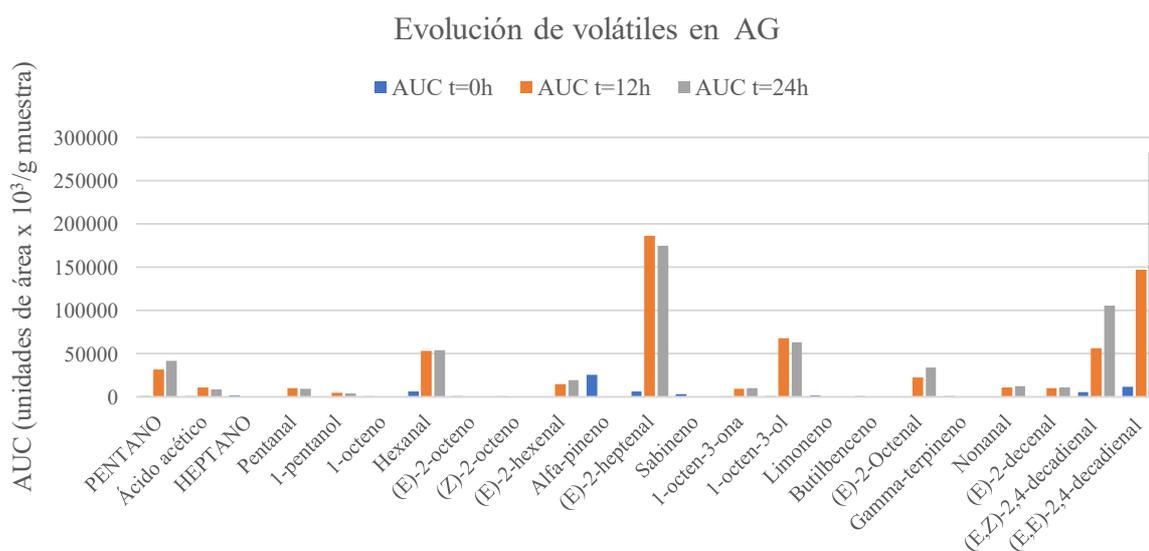


Figura 5. Muestra de AG (Aceite de girasol). Evolución de compuestos volátiles de la muestra a los diferentes tiempos (0h, 12h, 24h), expresado en función de AUC (unidades de área x 10³/g muestra).

De los resultados anteriores se extraen los compuestos volátiles considerados, en este trabajo, como destacados. Estos compuestos son aquellos cuyo valor de AUC se ha modificado (ha aumentado o disminuido) con el paso del tiempo o ha aparecido como resultado de la oxidación.

A continuación (Tabla 4) se muestran los compuestos que se han tenido en cuenta para cada muestra:

Tabla 4. Compuestos destacados en cada muestra.

Muestra AO	Muestra AG
Ácido acético	PENTANO
(E)-2-pentenal	Ácido acético
(E)-2-hexenal	Hexanal
(E)-3-hexen-1-ol	(E)-2-heptenal
(E)-2-hexen-1-ol	1-octen-3-ona
1-hexanol	1-octen-3-ol
(E)-2-heptenal	(E)-2-Octenal
1-octen-3-ona	(E,Z)-2,4-decadienal
1-octen-3-ol	(E,E)-2,4-decadienal
Octanal	
Acetato 3-hexen-1-ol	
1-octanol	
Nonanal	
(E)-2-decenal	

AO: Aceite de oliva; AG: Aceite de girasol

Una vez realizado el análisis de volátiles, se preparan 2 réplicas de cada uno de los viales para realizar el ensayo de TBA (24 tubos en total). A la hora de medir la absorbancia, el análisis se hace por cuadruplicado. Las siguientes figuras (Fig. 6 y 7) presentan un barrido de absorbancia entre 300-600 nm para cada una de las muestras:

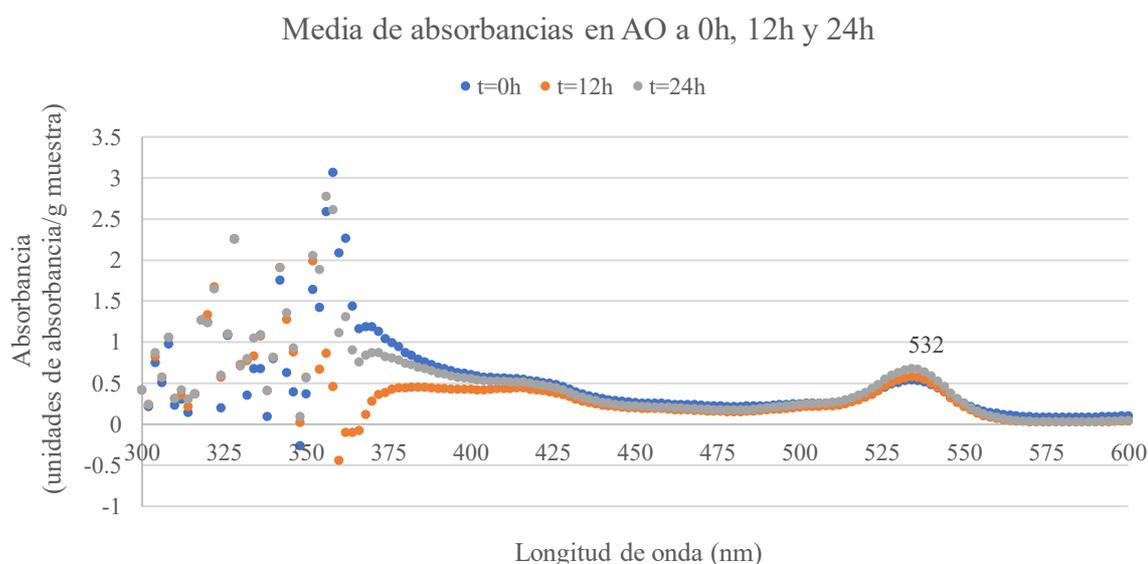


Figura 6. Barrido de absorbancia para AO (Aceite de oliva) entre 300-600 nm a cada uno de los tiempos. Se refleja el punto de absorbancia máxima a 532 nm. La absorbancia se expresa en unidades de absorbancia/g muestra.

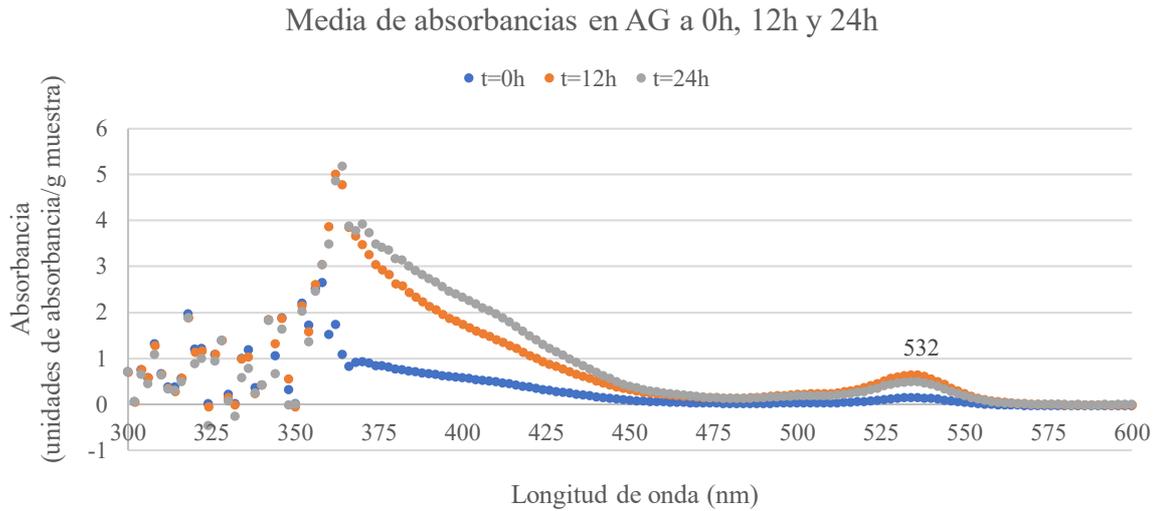


Figura 7. Barrido de absorbancia para AG (Aceite de girasol) entre 300-600nm a cada uno de los tiempos. Se refleja el punto de absorbancia máxima a 532 nm. La absorbancia se expresa en unidades de absorbancia/g muestra.

Una vez obtenidos los datos de cada uno de los ensayos por separado, y para responder al objetivo principal del trabajo, se combinan los resultados gráficamente para determinar si hay correlación entre ambos ensayos. En las siguientes figuras (Fig. 8 y 9), se representa para cada una de las muestras (AO y AG), la comparativa de los meq de MDA a 532 nm, obtenida a partir de la ecuación de la recta (Fig. 3), con el AUC total de los volátiles destacados. Este último dato se corresponde con la suma de las áreas de los compuestos mencionados en la Tabla 4.

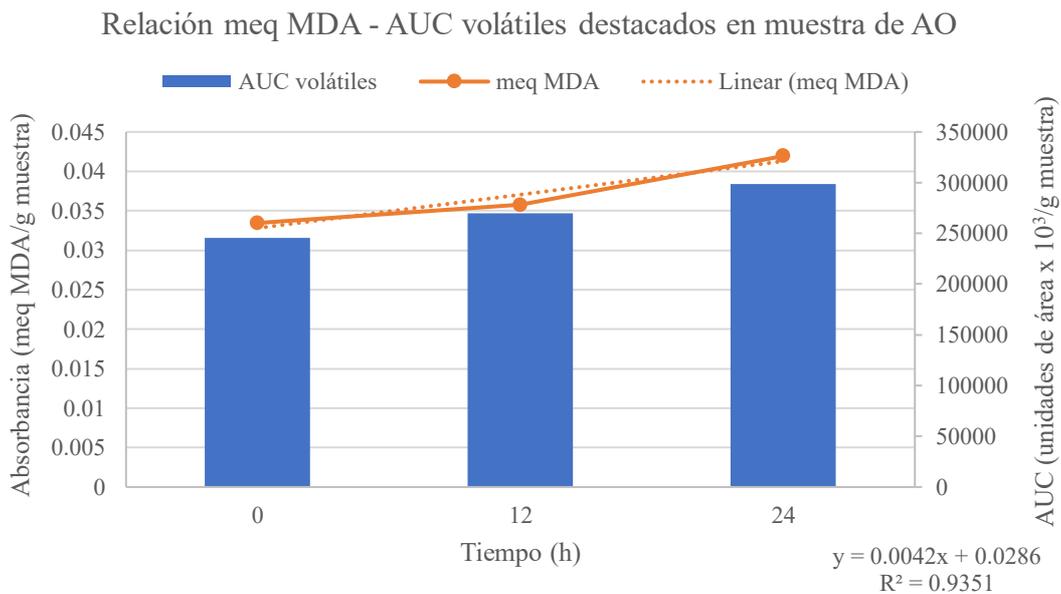


Figura 8. Muestra AO (Aceite de oliva). Correlación entre absorbancia en el ensayo de TBA (meq MDA a 532 nm) y compuestos volátiles destacados. La determinación de volátiles se expresa en función de su área bajo la curva (AUC), en unidades de área x 10³/g muestra.

Relación meq MDA - AUC volátiles destacados en muestra de AG

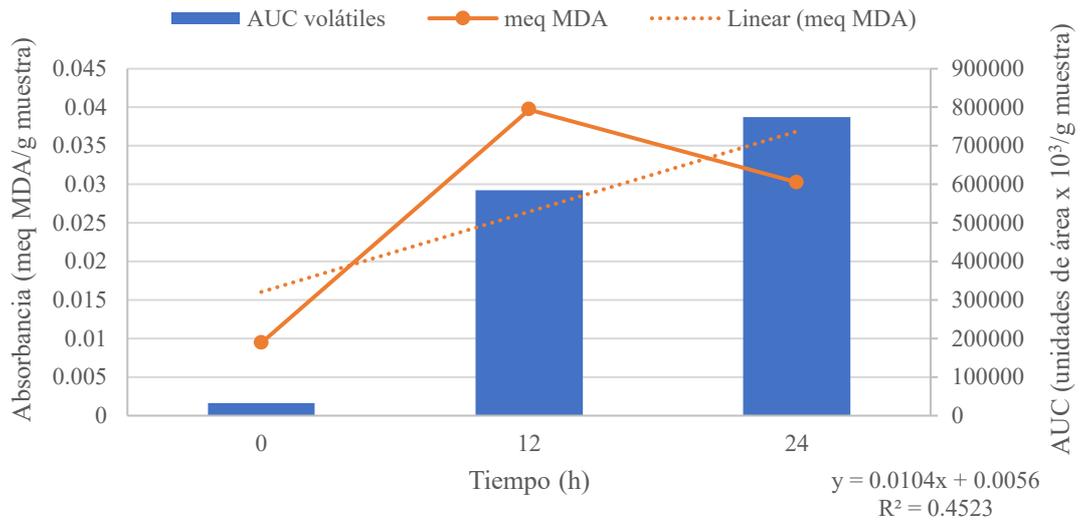


Figura 9. Muestra AG (Aceite de girasol). Correlación entre absorbancia en el ensayo de TBA (meq MDA a 532 nm) y compuestos volátiles destacados. La determinación de volátiles se expresa en función de su área bajo la curva (AUC), en unidades de área x 10³/g muestra.

Por último, para ver la absorbancia máxima de los compuestos resultantes de la oxidación del AO y AG, se presentan los valores de absorbancia (en el rango de 300-600 nm) de los patrones más representativos de oxidación para el AO, octanal y nonanal; y para el AG, (E,E)-2,4-decadienal y hexanal. (Fig. 10)

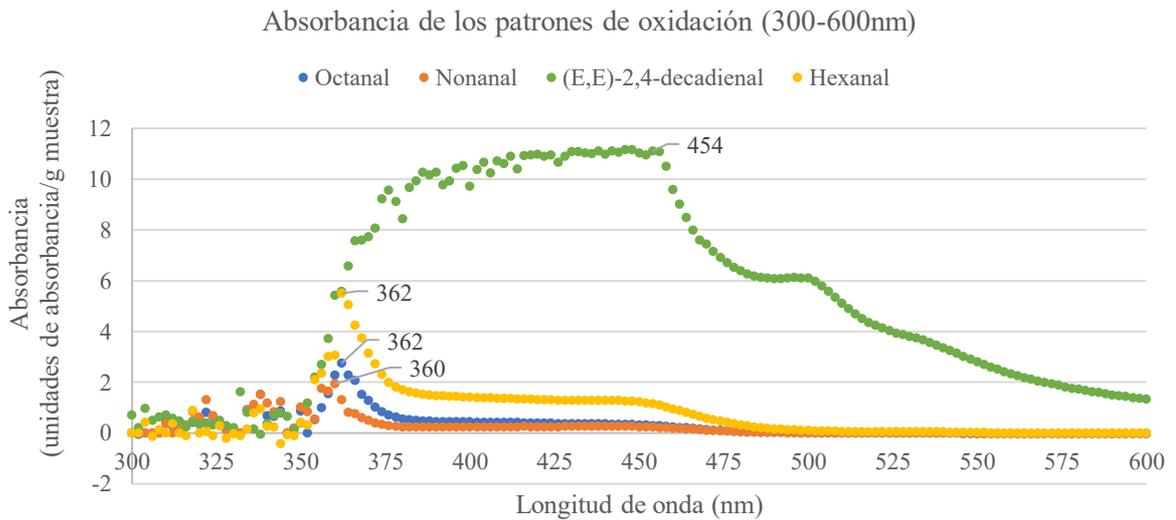


Figura 10. Valores de absorbancia en el rango 300-600 nm de los patrones representativos de oxidación para el AO (Aceite de oliva), octanal, nonanal; y para el AG (Aceite de girasol), (E,E)-2,4-decadienal, hexanal. Los valores mostrados en cada uno de los compuestos corresponden a la longitud de onda de mayor absorbancia: 454 nm para (E,E)-2,4-decadienal, 362 nm para octanal y hexanal y 360 nm para nonanal.

DISCUSIÓN

La oxidación lipídica es un proceso multifactorial y dinámico, por lo que es necesario tener en cuenta unas consideraciones previas para abordar, en este trabajo, la correlación entre las dos metodologías (HS-SPME-GC-MS y ensayo de TBA).

Las condiciones de oxidación a las que se somete la muestra influyen en el resultado de la prueba. En consecuencia, podría darse que los compuestos obtenidos mediante oxidación acelerada fueran diferentes a los obtenidos en las muestras oxidadas de forma natural (*Xu et al., 2018*). De ahí que, en este trabajo, tanto aceites como patrones puros se han sometido a las mismas condiciones experimentales.

La primera parte del proyecto consistió en conseguir un método que permitiera oxidar rápidamente las muestras de aceite, sin necesidad de aplicar temperaturas excesivamente altas. Empleando solo calor (90°C), la formación de volátiles no fue significativa, por lo que se planteó la posibilidad de utilizar metal, ya que como se ha mencionado anteriormente, este elemento puede iniciar la formación de los radicales libres. En este caso, por disponibilidad del laboratorio se utilizaron virutas de cobre y se decidió mantener el calor a 90°C. De esta manera, se consiguieron resultados satisfactorios en cuanto a la formación de compuestos volátiles, sin deterioro térmico de las muestras.

En relación a los datos obtenidos en el ensayo HS-SPME-GC-MS, se obtuvieron dos medidas para cada muestra y tiempo, de las cuales se presenta la media en las Tablas 2 y 3.

En el AO, se obtuvieron un total de 37 compuestos volátiles. Entre ellos, (E)-2-heptenal, octanal, nonanal y (E)-2-decenal se consideran los compuestos principales de oxidación porque su valor a las 24 horas es claramente mayor que a las 0 y 12 horas (Fig. 4). Además de estos compuestos, para establecer la correlación con el ensayo de TBA, se han tenido en cuenta los destacados que han sido mencionados en la Tabla 4.

El mayor incremento observado en estos compuestos concuerda con lo detectado en la oxidación del ácido graso puro (ác. oleico metilado), donde nonanal, octenal y 2-decenal fueron los compuestos mayoritarios. Desde un punto de vista cuantitativo, comparando los datos del AO con el patrón a las 24 horas (Tabla 2), las AUC del patrón son mayores. Esto se debe a que en el AO se pueden encontrar compuestos naturales (como el tocoferol

o vitamina E) con acción antioxidante que frenan la oxidación, y el patrón es un único compuesto, puro y desprotegido. Además, en la muestra, el ácido oleico está presente en un 68% del total de ácidos grasos, no un 100% como ocurre en el patrón.

En el dato de hexanal, se obtiene mayor AUC en la muestra que en el patrón puro de ácido oleico, ya que el aceite de oliva también contiene ácido linoleico, precursor del hexanal; de ahí el aumento en el valor del AUC.

En el AG, se obtuvieron un total de 23 compuestos volátiles, de los cuales hexanal, (E)-2-heptenal, (E,Z)-2,4-decadienal y (E,E)-2,4-decadienal destacaron como productos de oxidación del ácido linoleico. Estos datos concuerdan con lo expuesto por *Nieva-Echevarría et al., 2020* en un estudio de aceite de girasol. Para establecer la correlación con el método de TBA también se han tenido en cuenta los compuestos destacados, mencionados en la Tabla 4.

Al igual que ocurre con el AO, el dato del patrón para (E,Z)-2,4-decadienal y (E,E)-2,4-decadienal es mayor que en la muestra (Tabla 3); porque el patrón contiene mayor cantidad de ácido linoleico que la muestra, no tiene antioxidantes y por tanto se oxida con mayor intensidad.

Sin embargo, para el hexanal y (E)-2-heptenal el valor de la muestra es mayor que el del patrón, porque el AG también contiene otros ácidos grasos oxidables, susceptibles de dar lugar a estos volátiles.

Comparando ambas muestras, se puede observar que el número de compuestos obtenidos para el AO (Fig. 4) fue mayor que para el AG (Fig.5); pero si se observan los valores de AUC a las 12 y 24 horas, el dato es menor en el AO (Fig. 8). Este hecho apoya la idea que los aceites ricos en AGM son más resistentes a la oxidación que los aceites ricos en AGP. Esta idea también queda reflejada en la diferencia entre el valor de AUC a las 12 y 24 horas, mayor en el AG (Fig. 9) que en el AO.

Respecto a la correlación entre TBA y HS-SPME-GC-MS, objetivo principal de este trabajo, se presentan los resultados en las Figuras 8 (AO) y 9 (AG).

En las condiciones experimentales utilizadas en este trabajo, en el AO se obtuvo una alta correlación ($R_2 = 0,9351$), lo que implica que la cantidad de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, guarda buena relación con los compuestos volátiles que se han considerado como destacados al modificar su valor con el tiempo (Tabla 4).

Este hecho contrasta con lo mencionado anteriormente, y lo reflejado en el artículo de *Nieva-Echevarría et al., 2020*, sobre la infraestimación de la oxidación lipídica mediante el ensayo de TBA en aceites altamente monoinsaturados. (En el trabajo de *Nieva-Echevarría et al., 2020*, las muestras se calientan durante 55 minutos a 50°C y se protegen de la luz para evitar fotooxidación).

Además, se mantiene el gradiente en relación al tiempo observado en el barrido de absorbancia (Fig. 6); a mayor tiempo de oxidación, mayor cantidad de MDA y compuestos volátiles se obtienen. Este aumento en indicadores de oxidación puede estar controlado por la cantidad de antioxidantes presentes en el aceite, cuya concentración disminuye a mayor tiempo de exposición a las condiciones de oxidación (*Alberdi-Cedeño et al., 2019*).

Por todo ello, en el caso del AO se puede detectar la oxidación mediante la determinación de compuestos volátiles y por TBA de forma semejante.

Sin embargo, los resultados para el AG fueron diferentes. La correlación entre volátiles y TBA obtenida fue baja ($R_2 = 0,4523$) y el ensayo de TBA sobrestimó la oxidación lipídica respecto a los volátiles a tiempo 0 y 12 horas y la infravaloró a las 24 horas.

Los valores de meq de MDA a 532 nm no reflejan gradiente respecto al tiempo y el valor máximo es el correspondiente a las 12 horas (Fig. 7). Sin embargo, en los volátiles destacados sí que hay gradiente, de modo que a las 24 horas se produjo mayor oxidación que a las 12 horas.

En esta muestra se puso de manifiesto que los compuestos que se detectan por TBA no fueron los mismos que los que se detectaron por la técnica de HS-SPME-GC-MS, y por tanto habrá que tener en cuenta qué productos se obtienen en la oxidación para evaluarla con un método u otro según la muestra.

En el AG, a través de HS-SPME-GC-MS, los compuestos detectados en mayor proporción fueron los decadiales; en contraste con lo mencionado en *Xie et al., 2020*, donde la muestra se calentó 10 minutos a 35°C y el hexanal se consideró el predominante. La detección de estos compuestos es importante ya que tienen un alto impacto en el flavor de los aceites, así como de otros alimentos (*Petersen et al., 2012*).

Además de los decadienales, el resto de compuestos volátiles detectados tampoco reaccionaron con el TBA; pero ponen de manifiesto la oxidación lipídica debido a su bajo umbral de detección (Tabla 1). Por tanto, la oxidación lipídica en un aceite rico en AGP se detectará antes por la determinación de compuestos volátiles que por la absorbancia de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBA).

En cuanto al ensayo de TBA, la absorbancia se mide en un rango de 300-600 nm porque el MDA absorbe a 532 nm (*Barriuso et al., 2012; Poyato et al., 2014*).

Tanto el AO (Fig. 6) como el AG (Fig. 7) presentan un pico de absorbancia máxima a 532 nm. La diferencia está en que el AO tiene gradiente de absorbancia respecto al tiempo y el AG no. En el AO, la máxima absorbancia corresponde al valor de las 24 horas y en el AG, el valor máximo es el de las 12 horas. Esto implica que en el AG hay compuestos de oxidación, detectables por TBA y en menor medida por volátiles, que se degradan entre las 12 y 24 horas; por tanto, si se quiere conocer el grado de oxidación de forma cuantitativa, en el AG importaría el momento en el que se realiza el ensayo de TBA.

Al realizar el barrido de absorbancia en octanal, nonanal, (E,E)-2,4-decadienal y hexanal se obtuvieron las absorbancias máximas a 362, 360, 454 y 362 nm respectivamente (Fig. 10). Esto implica que si se realizase una única lectura a 532 nm, se infravaloraría la oxidación lipídica determinada por TBA.

Los patrones elegidos al oxidarse no dan lugar a un pico de absorbancia a 532 nm. En el caso del AO, octanal y nonanal no son los responsables del pico de absorbancia a 532 nm, pero en la variedad de compuestos producidos en la oxidación, alguno de ellos reacciona con TBA proporcionando un pico de absorbancia a 532 nm.

En el caso del AG se explica la ausencia de correlación porque sus productos principales de oxidación, los decadienales, no absorben a 532 nm e infravaloran la oxidación detectada por volátiles.

CONCLUSIONES

- El método propuesto de oxidación acelerada, a base de metal (cobre) y calor (90°C), fue efectivo.
- El trabajo confirmó que los AGM, principalmente en el aceite de oliva, son más resistentes a la oxidación que los AGP, presentes en el aceite de girasol.
- En el aceite de oliva se observó una alta correlación entre ambos métodos de medida de oxidación (HS-SPME-GC-MS y TBA), mientras que en el aceite de girasol la correlación fue más baja.
- En el caso de la muestra de aceite de girasol, la oxidación medida por TBA infravaloró la detectada mediante la cuantificación de compuestos volátiles por HS-SPME-GC-MS.
- De los resultados del AG se deduce que los compuestos detectados en el ensayo de TBA no son los mismos que los volátiles, por tanto, según la muestra y los productos de oxidación resultantes, será más adecuado un método u otro para valorar la oxidación.

BIBLIOGRAFÍA

- Alberdi-Cedeño, J., Ibargoitia, M. L., & Guillén, M. D. (2019). Monitoring of minor compounds in corn oil oxidation by direct immersion-solid phase microextraction-gas chromatography/mass spectrometry. New oil oxidation markers. *Food Chemistry*, 290(March), 286–294. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.04.001>
- Barriuso, B., Astiasarán, I., & Ansorena, D. (2012). A review of analytical methods measuring lipid oxidation status in foods: a challenging task. *European Food Research and Technology*, 236, 1–15.
- Bertolín, J. R., Joy, M., & Blanco, M. (2019). Malondialdehyde determination in raw and processed meat products by UPLC-DAD and UPLC-FLD. *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125009>
- Ghani, M. A., Barril, C., Bedgood, D. R., & Prenzler, P. D. (2017). Measurement of antioxidant activity with the thiobarbituric acid reactive substances assay. *Food Chemistry*, 230, 195–207. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.127>
- Landines Parra, M. Á., & Zambrano Navarrete, J. A. (2009). La oxidación lipídica en la cadena de producción acuícola. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 1(1), 13. <https://doi.org/10.22490/21456453.895>
- Ma, L., Liu, G., & Liu, X. (2019). Amounts of malondialdehyde do not accurately represent the real oxidative level of all vegetable oils: a kinetic study of malondialdehyde formation. *International Journal of Food Science and Technology*, 54(2), 412–423. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13952>
- Maszewska, M., Florowska, A., Dłużewska, E., Wroniak, M., Marciniak-Lukasiak, K., & Żbikowska, A. (2018). Oxidative Stability of Selected Edible Oils. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23(7), 15–17. <https://doi.org/10.3390/molecules23071746>
- Navarro-García, G., Bringas-Alvarado, L., & Pacheco-Aguilar, R. (2004). Nueva Herramienta para el Estudio de la Oxidación de los Ácidos Grasos, una de las Causas Fundamentales de la Pérdida de Calidad de los Alimentos para la Acuicultura. *Avances En Nutrición Acuícola VII, 1*, 480–503.
- Nieva-Echevarría, B., Goicoechea, E., & Guillén, M. D. (2020). Oxidative stability of extra-virgin olive oil enriched or not with lycopene. Importance of the initial quality of the oil for its performance during in vitro gastrointestinal digestion. *Food Research International*, 130(January), 108987. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.108987>

- Papastergiadis, A., Mubiru, E., van Langenhove, H., & de Meulenaer, B. (2012). Malondialdehyde Measurement in Oxidized Foods: Evaluation of the Spectrophotometric Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) Test in Various Foods Antonios. *Agricultural and Food Chemistry*, *60*, 9589–9594.
- Petersen, K. D., Kleeberg, K. K., Jahreis, G., & Fritsche, J. (2012). Assessment of the oxidative stability of conventional and high-oleic sunflower oil by means of solid-phase microextraction-gas chromatography. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, *63*(2), 160–169.
<https://doi.org/10.3109/09637486.2011.609158>
- Poyato, C., Ansorena, D., Navarro-Blasco, I., & Astiasarán, I. (2014). A novel approach to monitor the oxidation process of different types of heated oils by using chemometric tools. *Food Research International*, *57*, 152–161.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.01.033>
- Semeniuc, C. A., Mandrioli, M., Rodriguez-Estrada, M. T., Muste, S., & Lercker, G. (2016). Thiobarbituric acid reactive substances in flavored phytosterol-enriched drinking yogurts during storage: formation and matrix interferences. *European Food Research and Technology*, *242*(3), 431–439. <https://doi.org/10.1007/s00217-015-2554-3>
- Tarladgis, B. G., Watts, B. M., Younathan, M. T., & Dugan, L. (1960). A distillation method for the quantitative determination of malonaldehyde in rancid foods. *Journal of the American Oil Chemists Society*, *37*(1), 44–48.
<https://doi.org/10.1007/BF02630824>
- Xie, M., Dong, X., Yu, Y., & Cui, L. (2020). A novel method for detection of lipid oxidation in edible oil. *Lwt*, *123*(January), 109068.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109068>
- Xu, L., Yu, X., Li, M., Chen, J., & Wang, X. (2018). Monitoring oxidative stability and changes in key volatile compounds in edible oils during ambient storage through HS-SPME/GC–MS. *International Journal of Food Properties*, *20*(3), S2926–S2938. <https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1382510>