

VALORACIÓN ANALÍTICA Y NUTRICIONAL DE LAS GRASAS

R. Codony, F. Guardiola, R. Bou y A. Tres
Departamento de Nutrición y Bromatología
Universidad de Barcelona.

1.- INTRODUCCIÓN

La utilización de grasas como ingredientes en los piensos data de hace ya bastantes años y su uso tiene como objetivo principal el incrementar la concentración energética de los mismos, tanto por su mayor densidad calórica por gramo, como por la mejora que suponen de la eficiencia energética neta por kilocaloría de Energía Metabolizable. Pero al mismo tiempo, la incorporación de grasas en los piensos aporta otras ventajas colaterales, como es la mejora de las características de textura y palatabilidad, facilitando el proceso de granulación y facilitando la incorporación de determinados ingredientes. Por el contrario, la adición de estas grasas supone algunas desventajas, como pueden ser un manejo y conservación más complejo de piensos en harina y determinados granulados y, sobre todo, una disminución de la estabilidad oxidativa a lo largo del tiempo (Mateos et al., 1996; Wood et al., 2003; Bou et al., 2009).

Existen diferentes tipos de aceites, grasas y derivados que son utilizados para este fin y su mayor o menor utilización depende, en primer lugar, de su valor nutricional intrínseco. Pero existen otros factores que lo determinan, entre los que destacan, obviamente, su adecuación a las necesidades de la especie animal, así como a su edad. Otros factores no relacionados con su valor nutritivo que también son claves en su frecuencia de utilización son el coste y la disponibilidad de los mismos en cada momento. Podríamos agrupar las materias grasas utilizadas en piensos en tres tipos. En primer lugar los aceites y grasas “puras”, en segundo lugar los subproductos obtenidos de los anteriores y, finalmente, las mezclas entre materias grasas, tanto puras entre sí, como las mezclas conteniendo subproductos (Mateos et al., 1995; Dolz 1996; Nuchi et al., 2009). La

importancia de la utilización de una u otra fuente de grasa es grande, debido a las diferencias en su composición, que determinarán tanto sus propiedades físicas como su valor nutricional y su estabilidad oxidativa.

Así, dentro de los aceites y grasas puros podemos encontrar los de origen vegetal, que podríamos subdividir en los que son más saturados (coco, palmiste, palma), los monoinsaturados (oliva y semillas “alto oleico”) y poliinsaturados (maíz, soja, girasol, colza, etc). No obstante, esto es una simplificación, ya que dentro de cada subgrupo se presentan diferencias importantes que repercuten en sus propiedades. Así, dentro de las grasas vegetales saturadas, la palma contiene preferentemente ácido palmítico y es menos saturada, mientras que coco y palmiste son bastante más saturados y ricos en ácidos láurico y mirístico, y con menor proporción de palmítico. En contraste con la mayoría de aceites vegetales, las grasas animales son más saturadas en general, aunque entre ellas también presentan características diferenciales. Así los sebos de rumiantes son más saturados, la manteca de cerdo es algo más monoinsaturada y las grasas de ave son algo más poliinsaturadas. Los sebos presentan además ácidos grasos de cadena impar e isómeros *trans* y conjugados en ciertas proporciones, lo que resulta una característica muy específica de los mismos. En último lugar se encuentran los aceites de pescado, de alto contenido en ácidos grasos de cadena larga y elevado número de insaturaciones (EPA, DHA).

El segundo grupo antes definido, el de los subproductos grasos, incluye los *aceites ácidos* (también llamados *grasoleínas*), que proceden de la refinación química o física de los aceites y grasas, las *lecitinas* (separadas durante el desgomado de los aceites), los *ácidos grasos destilados* en la producción de glicerol, las *grasas de freiduría*, y otros subproductos de la industria de las grasas, como pueden ser *grasas fraccionadas*, *grasas hidrogenadas*, *jabones cálcicos*, etc (Mateos et al., 1995; Bockisch 1998). En algunos casos, la composición en ácidos grasos del subproducto es similar al producto de origen, pero en otros casos la composición es claramente diferente, como sucede con las lecitinas, las grasas hidrogenadas o los jabones. La utilización de subproductos suele realizarse en mezclas, debido a que su valor nutritivo es menor y la mezcla consigue mejorarlo. Obviamente, en este grupo de subproductos grasos es donde nos podemos encontrar una mayor variabilidad en la calidad, en general, y en el valor nutritivo en particular. El grupo de subproductos grasos y el de sus mezclas presentan un problema particular de falta de normalización en sus características de composición y calidad, que conlleva una elevada variabilidad de las mismas (Nuchi et al., 2009). Son por ello también los que presentan más dificultades en su control y valoración analítica.

Todas estas diferencias, que hemos centrado sobre todo en las diferencias en su composición en AG, deben extenderse a otros factores de composición que también tienen

repercusiones importantes en el valor nutritivo, en la estabilidad o en la calidad general. Entre estos factores cabe destacar el contenido en tocoles; el contenido en ácidos grasos libres (AGL) y en mono- (MG) y diacilgliceroles (DG); el contenido en polímeros de los triacilgliceroles; y el contenido en diversos compuestos de oxidación, entre otros. Aunque habitualmente poco considerados, también otros factores pueden ser relevantes, como la distribución posicional de los ácidos grasos dentro de las moléculas de los triacilgliceroles (TG), que puede condicionar de forma importante su tasa de absorción a nivel digestivo.

2.-VALOR NUTRITIVO DE LAS GRASAS PARA PIENSOS

El valor nutritivo de las grasas, como ya se ha mencionado anteriormente, se centra fundamentalmente en su aporte energético más elevado (alrededor de 9 kcal/g) en relación con el resto de componentes del pienso. Sin embargo, este valor es variable de una grasa a otra, debido a dos factores fundamentales. El primero es su porcentaje de ácidos grasos, que son los que suministran básicamente esta energía. El segundo factor determinante es su digestibilidad, es decir la fracción de los ácidos grasos presentes en la grasa que son absorbidos de forma eficiente después de la digestión. Esta digestibilidad (digestión y absorción) viene determinada por diversos factores, entre los cuales pueden citarse varios, cuyos efectos han sido claramente comprobados (Mu y Hoy 2004). Entre ellos destacan la composición porcentual en los diferentes ácidos grasos; la estructura de los TG; el porcentaje relativo de cada triacilglicerol en la composición global; el porcentaje de MG y el porcentaje de ácidos grasos libres.

Así como los factores primero y último son bien conocidos y se utilizan de forma práctica, por ejemplo para el planteamiento de las ecuaciones de cálculo de la energía metabolizable de una grasa, el efecto de la estructura de los TG es menos conocida y utilizada en la práctica. No obstante, en los últimos años comienzan ya a acumularse bastantes estudios sobre este aspecto, que permiten observar claramente un efecto significativo que debería tenerse en cuenta. Numerosos estudios con animales han establecido una influencia de la composición química de la grasa dietética sobre su utilización y sobre su valor energético, indicando que la longitud de la cadena y el grado de insaturación de los ácidos grasos constituyentes tienen un efecto relevante sobre el valor nutritivo de la dieta (Garret y Young, 1975; Ozimek et al., 1984; Blanch et al., 2000). La reducción potencial de la digestibilidad lipídica y de otros nutrientes es uno de los principales puntos críticos en el uso de grasas saturadas en los piensos comerciales. Un aumento de la proporción de ácidos grasos saturados tienen un impacto negativo en la digestibilidad y disponibilidad energética de la dieta, particularmente en animales jóvenes y, particularmente, a bajas temperaturas en peces (Torstensen et al., 2000; Ng y Bahurmiz,

2007). En este sentido, se ha podido establecer claramente en ensayos con pollos y cerdos que existe un descenso del valor nutritivo a medida que aumenta el % de ácidos grasos libres y de ácidos grasos saturados, y ello se agrava en animales jóvenes respecto a los adultos (Wiseman y Salvador, 1989; Jorgensen et al., 2000). Algunos estudios publicados han aportado evidencias de la existencia de ciertos efectos debidos a la posición de los ácidos grasos en la molécula de los TG, así como también a la adición de agentes emulsionantes a la grasa del pienso (por ejemplo, lecitinas y MG). En particular, la distribución de ácidos grasos en los TG puede afectar a diversos parámetros físico-químicos y a propiedades fisiológicas, y se revela como un factor clave para evaluar el valor nutritivo y las repercusiones sobre la salud. Es bien conocido que los ácidos grasos saturados de cadena larga son mejor absorbidos a partir de los TG que contienen estos ácidos en la posición sn-2 que de aquellos que los contienen en posición sn-1 ó sn-3 (Kritchevsky, 1988; Decker, 1996; Innis et al 1997; Karupaiah y Sundram, 2007).

La digestión, absorción y transporte de lípidos es un proceso muy complejo y el efecto final depende de diversos factores complementarios, como son la estructura de los TG, la estructura de los ácidos grasos, la presencia de MG y otros lípidos con capacidad emulsionante, el pH del estómago, etc (Mu y Hoy, 2004). La longitud de la cadena de los ácidos grasos es un factor clave en su capacidad de solubilización y, por lo tanto, de ser fácilmente absorbidos, independientemente incluso de su grado de insaturación (Dolz, 1996). Así, en el caso de los ácidos grasos saturados, que son los menos digeribles por ser menos hidrosolubles, a medida que se acorta la cadena aumenta drásticamente su solubilidad. En consecuencia, las grasas ricas en ácidos láurico y mirístico, como la de coco, presentan un valor energético muy superior a los sebos (ricos en palmítico y esteárico), particularmente en animales monogástricos de corta edad. Como describe Bracco (1994), la distribución estereoespecífica de los ácidos grasos en la molécula de los TG condiciona sus propiedades físicas, como son el punto e intervalo de fusión, lo que es utilizado desde un punto de vista tecnológico para modificar en forma adecuada dichas propiedades. Por la misma razón, el proceso de absorción en la mucosa intestinal, la resíntesis en quilomicrones, y la liberación final en el hígado en forma de lipoproteínas se ven afectados por las propiedades físico-químicas de la mezcla de ácidos grasos libres, 2-MG y TG residuales, provenientes de la digestión. La formación de micelas y la solubilización en agua dependen de forma crítica de estas propiedades. En este sentido, ha sido descrito un efecto sinérgico entre componentes lipídicos debido al efecto emulgente de los compuestos más hidrosolubles, que mejoran la solubilización micelar de aquellos componentes lipídicos menos solubles. De hecho, la presencia de ácidos grasos insaturados y/o fosfolípidos en combinación con ácidos saturados potencia la absorción y el correspondiente valor energético de la mezcla grasa (Wiseman y Lessire, 1987).

Diversos autores, en relación con el metabolismo de los TG reestructurados, indicaron que existen evidencias de ciertos efectos debidos al cambio de posición de los ácidos grasos saturados de la posición sn-1 ó sn-3 a la sn-2 del triacilglicerol (Kubow, 1996; Mu y Porsgaard, 2005). En general, la ingesta de estos TG estructurados por reesterificación puede afectar claramente los procesos de absorción, metabolización y acumulación de ácidos grasos, e inducir cambios en diversos marcadores bioquímicos habituales, como la agregación plaquetaria y los TG y colesterol plasmáticos en diversas especies animales. Sin embargo, existe cierta controversia en relación con la conservación o no de esta distribución estereoespecífica de los ácidos grasos durante su distribución a los tejidos (Karupaiah y Sundram 2007; Tuomasjukka et al., 2009).

De forma simplificada, si consideramos los animales monogástricos, y de acuerdo con lo que recogen Mateos et al. (1996), podemos definir cuatro factores principales que afectan a la digestibilidad y valor energético de las grasas. Estos son: 1) el contenido de “energía bruta”; 2) la proporción de ácidos grasos a la forma libre vs la proporción que están en forma de TG; 3) el grado de insaturación de los ácidos grasos; y 4) la longitud de la cadena de los ácidos grasos. Sin embargo esta es una aproximación simplificada, de acuerdo a todo lo que hemos comentado anteriormente. Así, en relación con el punto (2) debería tenerse en cuenta que no sólo tiene una influencia negativa en la digestibilidad la proporción de ácidos libres, sino que una cierta proporción de MG podría favorecer la digestibilidad general de la grasa. Igualmente, en relación con el punto (3) hay que destacar que no todos los ácidos insaturados tienen igual digestión y absorción; y de la misma forma, respecto al punto (4) cabe comentar que la longitud de la cadena no es un factor de relevancia tan general, pues los ácidos grasos mayoritarios en casi todas las grasas presentan 16 o 18 átomos de carbono, y sólo para algunas grasas encontramos proporciones elevadas de ácidos de cadena más larga (pescado) o de cadena media o corta (coco, palmiste, grasa lácteas). De la misma forma, a todos estos factores debería añadirse el factor relacionado con la distribución de los ácidos grasos en la molécula de los TG, que también determina una mayor o menor absorción de los ácidos grasos menos digeribles.

Para los rumiantes el valor nutritivo de una grasa es muy diferente, ya que la acción de los microorganismos en el rumen afecta claramente a la composición en ácidos grasos. Así por ejemplo, se generan proporciones apreciables de ácidos grasos *trans*, ácidos grasos conjugados y ácidos grasos de cadena impar y ramificados. Por otra parte, dichos microorganismos pueden ver afectada negativamente su actividad por algunos componentes de la grasa, como es el caso de elevadas proporciones de ácidos grasos libres o ácidos grasos poliinsaturados.

En consecuencia, queda claro que el establecimiento del “contenido energético neto” de una grasa es una tarea compleja, ya que deben confrontarse los caracteres de composición de la grasa con los factores antes señalados, tanto los endógenos (especie animal, edad) como los exógenos (ambientales, tipo de dieta, etc). Por ello, existen discrepancias entre los cálculos propuestos por diferentes autores que han establecido ecuaciones para resolver este valor energético en diferentes especies y situaciones. Existen ecuaciones diversas, que utilizan también factores diversos, aunque la tendencia más adecuada sería aquella que contempla las proporciones individuales de los principales ácidos grasos (palmitico, esteárico, oleico, linoleico, ...). A partir de estas fórmulas, se aproximan los valores energéticos de las principales grasas y aceites. No obstante, el problema que queda aún por resolver es como calcular de forma más exacta este valor energético para los subproductos grasos y sus mezclas en los que podemos encontrar valores anormalmente elevados de algunos componentes, como pueden ser los ácidos grasos libres, los MG y DG, los compuestos oxidados y polimerizados, etc.

3.-VALORACIÓN ANALÍTICA DE LAS GRASAS PARA PIENSOS

En consecuencia, ello nos lleva a plantear, para analizar una grasa en relación con el valor nutricional global, y el energético en particular, una serie de parámetros analíticos que permitan valorar los diversos componentes responsables de estas propiedades nutricionales.

De una forma exhaustiva, podemos citar una lista de parámetros que podrían ser utilizados para obtener información relevante respecto al valor nutritivo y calidad general de una grasa o aceite. Entre estos podríamos citar como más relevantes los siguientes:

- Humedad
- Impurezas
- % Insaponificable
- % Materia no eluible
- Índice de peróxidos
- Índices de oxidación secundaria (TBA, p-anisidina, dienos conjugados ...)
- % Dímeros y Polímeros de los triacilgliceroles
- % Ácidos grasos totales
- Índice de yodo
- Índice de saponificación
- Composición en ácidos grasos. Incluye por tanto % de linoleico, % de AG omega-6 y omega-3, % de saturados, % de insaturados, % AG *trans*, etc.

- % Fosfolípidos
- Posición de los ácidos grasos en los acilgliceroles
- Índice de acidez
- Porcentaje de mono, di y triacilgliceroles
- Contenido en tocoferoles y tocotrienoles
- Contenido en otros componentes del insaponificable
- Otros componentes más específicos

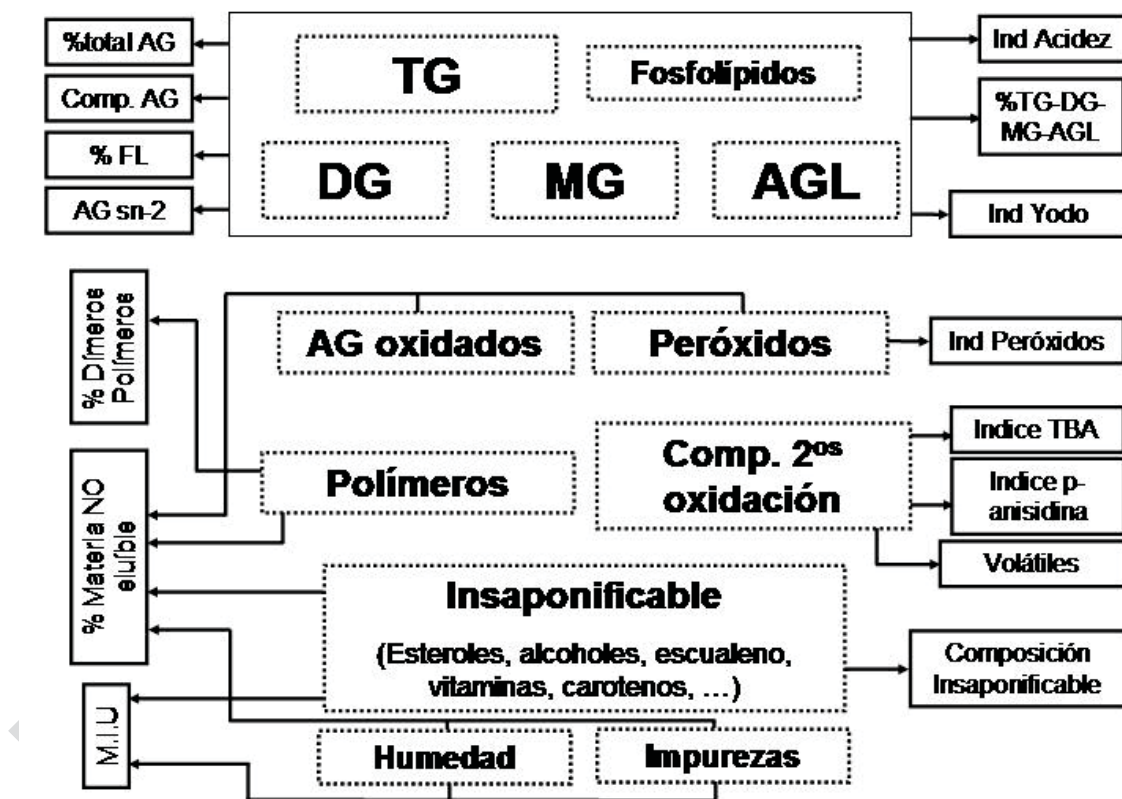
En una primera aproximación, podríamos decir que los anteriores parámetros analíticos podrían ser agrupados en tres tipos. En primer lugar, aquellos que son fundamentales y, de una forma u otra, deberíamos determinar para conocer realmente el valor de una materia grasa; en segundo lugar, aquellos que podríamos considerar interesantes en determinadas ocasiones para acabar de valorar la materia grasa (pero que no son de valor tan universal y su determinación dependería del tipo de grasa, del conocimiento previo de la misma, etc); y en tercer lugar, aquellos parámetros que podemos considerar, en general, menos útiles y que sólo encuentran, por ello, aplicaciones muy específicas.

La figura 1 muestra como se relacionan los principales componentes propios y de alteración de las grasas y aceites con los parámetros analíticos más relevantes que permitirían su evaluación respectiva. Obviamente, entre estos parámetros se encuentran algunos que permiten determinar fracciones más o menos complejas de la grasa que, por su alto valor nutritivo o al contrario por su bajo valor nutritivo, deben tenerse en cuenta para el cálculo del valor energético. Después, existen otras determinaciones más selectivas, que nos permiten establecer valores relativos a la presencia de compuestos específicos, cuyos valores de concentración en la grasa afectan también positiva o negativamente el valor nutritivo. Esta figura recoge ya una cierta reducción en el número de parámetros a considerar, respecto a la lista anterior. Pero aun así, existen aún algunos solapamientos entre algunos de estos parámetros que conviene discutir, para establecer las diferencias en la información que nos suministraría la determinación de algunos parámetros que parecen a priori bastante similares. Por otra parte, también debemos discutir aquí algunos parámetros que, aún siendo a veces bastante utilizados, no ofrecen una información clara sobre el valor nutritivo o calidad de una grasa.

Un primer ejemplo es la determinación de peróxidos y de otros compuestos de oxidación de los AG y TG. La clásica determinación del Índice de peróxidos nos daría información sobre el contenido de la mayor parte de los grupos peróxido contenidos en las cadenas de los ácidos grasos, pero no nos daría información sobre el contenido de otras formas oxidadas también presentes. Por otra parte, existen métodos que nos permiten

determinar el % de formas oxidadas de los ácidos grasos, como es la determinación de la fracción de la grasa *insoluble en éter de petróleo*, que englobaría fundamentalmente la mayoría de formas oxidadas de los AG, incluyendo los peróxidos, aunque es una determinación bastante engorrosa y con un cierto error, ya que algunas formas oxidadas podrían solubilizarse mientras que, por otro lado, algunos compuestos polares diferentes a los AG oxidados podrían quedar en el residuo insoluble. Por otra parte, también debemos considerar que otras determinaciones, como el “% impurezas” o “% materias no eludibles”, comprenden ya dentro de su valor el contenido de peróxidos.

Figura 1.- Relación entre componentes de una materia grasa y los parámetros analíticos que permiten su evaluación respectiva.



Otro ejemplo de discusión global en la significación de parámetros dirigidos a evaluar un grupo relacionado de compuestos en la grasa puede ser el de los productos de hidrólisis. En este caso, el parámetro tradicional es el Índice de acidez, que nos da un valor de la cantidad de ácidos libres en la grasa, valor importante para el cálculo del valor nutritivo, ya que los ácidos libres son menos digeribles que los acilglicérols. Pero al mismo tiempo, la hidrólisis libera también MG y DG, que pueden actuar como emulgentes y aumentar la digestibilidad de la grasa. Por ello, una determinación analítica que nos dé

los valores de % de MG, DG y AGL aporta información complementaria para evaluar más exactamente la influencia que puedan tener en el valor nutritivo de la grasa.

Otro ejemplo es el de la determinación de la composición en ácidos grasos. Esta determinación es muy útil y sustituye con ventajas a los Índices de Yodo y de Saponificación ya que nos da valores del contenido de cada AG y no sólo una información global del grado de insaturación o de la longitud media de las cadenas de los AG. Esta información es clave, obviamente, para establecer el valor nutritivo de una grasa. Pero también en este caso podríamos ir algo más lejos analíticamente, para poder conocer no sólo el % global de cada AG, sino como se distribuyen estos AG dentro de los TG de la grasa. Esto es importante desde el punto de vista nutricional, ya que la digestión de los monogástricos libera AG y 2-MG a partir de los TG de la grasa, y un ácido graso en su forma de 2-MG es más digerible que en su forma de ácido libre. Así por ejemplo, las grasas que poseen mayor % de AG saturados en posición 2 (manteca de cerdo, p.ej.), favorecen una mayor absorción de estos AGS que las que poseen los mismos AG situados preferentemente en posiciones 1 y 3 de los TG (sebos o cacao, p.ej.).

A continuación, en la presentación individual de los parámetros analíticos seleccionados discutiremos los siguientes aspectos:

- Propiedades de la grasa que evalúan el parámetro
- Relación con el valor nutricional
- Aplicabilidad y posibles fallos en la significación de los resultados

3.1. - % Insaponificables

El valor comúnmente denominado “MIU” reúne de hecho la suma de la determinación de tres valores que representan en su conjunto una parte significativa dentro de la composición de todas las grasas y aceites, y que tienen nulo valor energético. Debemos conocerlo pues para restarlo del 100% antes de calcular la energía de la materia grasa en cuestión.

La fracción no saponificable constituye la mayoritaria dentro del MIU, ya que en algunas grasas y aceites puede superar el 5% del total de la grasa. El % de insaponificables (AOAC 18th ed. Official Method 933.08) se determina por el clásico procedimiento de saponificación con álcali en medio metanólico y extracción con éter etílico de la fracción insaponificable a partir de la mezcla obtenida (existe una alternativa que usa el éter de petróleo, que no extrae exactamente los mismos componentes). Finalmente se evapora y se

pesa el residuo seco, que corresponderá a la fracción insaponificable de la muestra que hemos pesado inicialmente.

3.2. - Humedad

En las grasas de calidad el % de humedad es normalmente inferior al 1%, pero en subproductos grasos pueden encontrarse valores apreciables, que pueden superar el 5% (Nuchi et al., 2009). Debido a los bajos valores que pueden presentarse es muy necesaria la utilización de un método estandarizado de desecación. El método oficial más recomendado (AOAC 18th ed Official Method 926.12; ISO 662:1998) utiliza la desecación en estufa a 103 °C, que de hecho determina conjuntamente el % de agua y de impurezas volátiles.

3.3. - % “Impurezas”

Esta determinación es poco selectiva y tiene una base empírica (ISO 663:2007). Según este método, se define el resultado como el “contenido de impurezas insolubles en hexano (o éter de petróleo)”. Estas impurezas comprenden, en las condiciones que utiliza el método, las impurezas mecánicas, sustancias minerales, resinas, materia nitrogenada, jabones, ácidos grasos y glicéridos oxidados e hidroxilados. Por lo tanto, si sumamos este valor al de humedad y fracción insaponificable, sólo quedaría añadir los polímeros de TG para obtener el % total de materias no digeribles de una materia grasa. El método de determinación de las “impurezas” consiste en desecar y pesar un embudo con papel de filtro o un crisol filtrante, y filtrar a continuación la mezcla de grasa y hexano (o éter de petróleo) que ha sido agitada previamente. Después de secar el embudo o crisol filtrante con el residuo recogido, se vuelve a pesar y se resta el peso inicial del filtro.

3.4.- % Materia no eluible

Este parámetro permite sumar a los tres tipos de componentes no energéticos anteriores un cuarto grupo que son los dímeros/polímeros de los acilgliceroles. Es por lo tanto un método muy útil, aunque de valor aproximativo y que pierde su significación a valores <2%, debido a su variabilidad. El procedimiento (AOAC 18th ed Official Method 977.17) se basa en añadir un peso conocido de un triglicérido (triheptadecanoína) como patrón interno a un peso conocido de la grasa, preparar los ésteres metílicos de los AG (primero por saponificación con NaOH y después transmetilación con BF₃/metanol) y extraerlos con éter de petróleo, y finalmente inyectarlos en el cromatógrafo de gases. Comparando el área obtenida para el patrón interno con la suma de áreas totales, se obtendrá un valor del total de AG eluidos que debería corresponder al peso total de grasa. Como se obtienen valores inferiores, se asume que la diferencia (*Materia no eluible*)

corresponde a los compuestos de alteración polares, impurezas e insaponificable, que no eluyen de la columna cromatográfica y no son considerados en la suma total de picos recogidos en el cromatograma. El método que comentaremos más adelante (3.12), que determina el total de AG digeribles expresado como TG, representa una evolución de este parámetro y ofrece una mayor aproximación al valor energético metabolizable (sin tener en cuenta obviamente la digestibilidad y absorción afectada por factores de insaturación, AGL, etc).

3.5. - Índice de peróxidos y otras determinaciones de oxidación primaria

La determinación de los compuestos de oxidación es una determinación sobre la cual podríamos discutir largamente su pertinencia a efectos nutricionales. En un principio, podemos decir que de hecho una parte muy significativa de los peróxidos, juntamente con otros ácidos oxidados, ya habrían quedado englobados dentro del valor que hemos denominado como “% impurezas insolubles”. No obstante, el Índice de Peróxidos es una determinación interesante para establecer la calidad de las materias grasas, ya que nos da información de la calidad de la materia prima, de los procesos que se han utilizado y de su adecuada o inadecuada conservación. No obstante, desde el punto de vista de la afectación del valor energético, su significación es más discutible, pues su proporción respecto al total de la grasa siempre será baja y, además, es bien conocido que los peróxidos lipídicos pueden ser absorbidos en una proporción media del 50% a nivel intestinal. Pero la cuestión más discutible deriva del hecho de que valores bajos de peróxidos no indican forzosamente una mayor calidad y un bajo nivel de degradación en una grasa. Ello se debe a que los peróxidos son poco estables, particularmente por encima de los 50 °C, por lo que un valor bajo de peróxidos puede indicar que la grasa está muy poco alterada o, por el contrario, que está tan alterada que los peróxidos se han destruido ya para formar otros compuestos secundarios (aldehidos, hidrocarburos, ácidos, polímeros, etc). Además, la refinación de las grasas reduce parcialmente el contenido de peróxidos. Por estas razones, deberíamos decir que el valor del índice de peróxidos que presente una grasa debe interpretarse a la luz de su origen y procesos que haya experimentado. En principio, en aceites y grasas puras, de origen animal o vegetal, los valores encontrados para los peróxidos son siempre bajos, excepto que no hayan sido conservados en buenas condiciones o bien que hayan sido conservados un tiempo excesivo. Si analizamos los índices de oxidación secundaria, se observarían también valores bajos. Por el contrario, para los subproductos grasos, que suelen pasar procesos más agresivos que generan peróxidos, es fácil también encontrar valores de peróxidos relativamente bajos (sobre todo si se han conservado a baja temperatura), pero sus valores de Índices de oxidación secundaria o los valores de polímeros serían generalmente bastante elevados. Los resultados obtenidos por Nuchi y colaboradores (2009), relativos a los valores habituales de productos de alteración en una

serie de muestras de co- y subproductos grasos recogidas en diferentes países europeos, corroboran este hecho. Así, p.ej., encontraron valores medios de Índices de peróxidos inferiores a 1,0 para los aceites ácidos de refinación química y los destilados de palma hidrogenados, mientras que los valores para grasas animales diversas, aceites ácidos de refinación física e incluso para aceites de pescado se situaban entre 1,0 y 2,0. Únicamente los aceites reciclados de cocina presentaron valores medios de 7,6 que tampoco son excesivamente altos. Por lo tanto, todos presentaron valores relativamente bajos de peróxidos, pero no se observaba lo mismo para los valores de oxidación secundaria. Así, los valores del Índice de TBA para aceites de pescado presentaron una media de 1851, y para el resto de grasas antes mencionadas se observaba una mayor dispersión de sus valores de oxidación secundaria. Así, las grasas animales y los destilados de palma hidrogenados presentaron valores casi nulos de Índice de p-anisidina, los aceites ácidos de refinación química valores medios de 16,7, los de refinación física 35, los aceites reciclados de cocina 55,0 y los aceites de pescado 73,5.

El método tradicional para la determinación de los peróxidos lipídicos es el “Índice de peróxidos volumétrico” (AOCS Cd 8-53; IUPAC II.D.13; AOAC 18th ed. Official Method 965.33; EEC Regulation 2568/91). Su fundamento es la oxidación del ión yoduro a yodo, en medio ácido, por parte de los peróxidos lipídicos presentes en la grasa disuelta en cloroformo. El yodo formado se valora con una solución normalizada de tiosulfato sódico, con engrudo de almidón como indicador. Los resultados se expresan, habitualmente, en *meq de oxígeno por kg de grasa*, ya que los peróxidos tienen estructuras variadas y no conocidas exactamente.

$$\text{meq O/kg grasa} = (V \text{ ml tiosulfato}) \cdot (N \text{ tiosulfato}) \cdot 1000/\text{peso grasa en g}$$

Otro factor que hace discutible esta determinación es el carácter empírico de la medida. Por ello, a pesar de su gran aplicación, es un método que presenta una serie de dificultades que pueden conducir a resultados poco exactos y/o reproducibles. La primera es la escasa solubilidad del yoduro en cloroformo, lo que hace necesaria una continua y enérgica agitación durante toda la valoración para favorecer el contacto entre fase acuosa y orgánica. En relación con esta cuestión, el oxígeno en contacto con el yoduro se renueva de forma eficaz con la agitación, lo que puede provocar su oxidación, dando errores por exceso en la medida de los peróxidos. Otras fuentes de error son, la acción catalítica de la luz sobre la oxidación del yoduro, y la fijación de yodo por los dobles enlaces en grasas muy insaturadas. Así mismo, la reacción de oxidación del yoduro no es muy rápida, lo que puede provocar una imprecisión en la observación del punto final. Finalmente, la sensibilidad de la reacción no es muy grande (0,5 meq O/ kg grasa). Todo ello, ha llevado a intentar introducir modificaciones que permitan hacer la medida más exacta y precisa.

Por ejemplo, la determinación electrométrica del punto final, en lugar de la apreciación visual del color. El desplazamiento del aire en el matraz de valoración, usando una corriente de nitrógeno. Finalmente, el peso de muestra debe forzarse para medidas de grasas poco oxidadas (hasta 5 g o más gramos), para obtener una respuesta suficiente. No obstante, todo ello hace que el método resulte, en general, impreciso y que los resultados dependan, tanto de la naturaleza de la muestra, como del técnico analista y sus hábitos de procedimiento.

Como alternativa existen los métodos de medida colorimétricos. Para conseguir una medida más reproducible y exacta, algunos autores han desarrollado alternativas de tipo colorimétrico para disponer de sistemas de determinación más sensibles y reproducibles, aunque siguen presentando ciertos problemas derivados de las interferencias oxidativas, difíciles de evitar. Esta mayor sensibilidad permite disminuir las exigencias en cuanto al tamaño de muestra necesario (hasta unos 100 mg). Entre estos métodos los más utilizados son los basados en la oxidación del Fe(II) a Fe(III) por los peróxidos y la posterior reacción del Fe (III) formado con reactivos específicos, como el tiocianato potásico, el 2,6-diclorofenolindofenol o el naranja de xilenol (Navas et al., 2004).

Otra alternativa utilizada, pero que no da buenos resultados en todas las grasas y aceites, es la determinación de los “dienos conjugados” (DC) (AOCS Ti 1^a-64; EEC No 2568/91; ISO 3656:2002). La formación del hidroperóxido en la cadena de un ácido graso poliinsaturado comporta el desplazamiento de un doble enlace hacia el carbono del grupo metilénico anexo, con la consecuencia de la formación de un dieno conjugado. La medida de la absorbancia al UV a 230-234 nm (correspondiente a dichos dienos conjugados) es, por lo tanto, un buen parámetro para evaluar el proceso oxidativo inicial de una grasa. Los aceites vegetales por ejemplo, en sus primeras etapas de oxidación, alcanzan valores de hasta 6% de ácidos grasos diénicos conjugados, pero debe tenerse en cuenta que el proceso sigue la misma curva descrita para el Índice de Peróxidos, ya que cuando aumenta la velocidad de destrucción de peróxidos, el nivel de dienos conjugados llega a estabilizarse e incluso disminuir con el tiempo. Además, determinados compuestos secundarios de oxidación, procedentes de la destrucción de los peróxidos, pueden también tener estructuras de dieno conjugado (aldehidos monoinsaturados), que también participarían en la lectura espectrofotométrica. Además, la curva de evolución de la absorbancia a 232 nm, en función del tiempo, es compleja de interpretar, ya que otros procesos como la refinación de las grasas pueden dar origen a la formación de dienos y trienos conjugados. Respetando estas limitaciones, y con una adecuada utilización en cada caso, la medida del % de dienos conjugados por espectrofotometría UV se muestra como una técnica de gran interés, simple y reproducible, y con escasos requerimientos metodológicos y de habilidad del operador. La lectura espectrofotométrica se realiza por

disolución de una cantidad variable de la grasa (según el grado de oxidación esperado). Hay diferentes propuestas metodológicas para realizar esta medida que se diferencian en el tipo de disolvente a utilizar: metanol (recomendable para los ésteres de AG); o bien isooctano, hexano o ciclohexano (para los TG o grasas enteras). Los resultados se expresan usualmente como % de dienos conjugados, según la fórmula (para una cubeta de 1 cm de espesor)

$$\% \text{ DC} = 0,84 \cdot [(A / C) - K_0]$$

donde A es la medida de la absorbancia de la disolución de la grasa a 232 nm, C es la concentración de dicha solución preparada y K_0 es la absortividad correspondiente al enlace éster (0,07) o ácido (0,03). El método presenta una excelente precisión, si está adecuadamente normalizada su aplicación y la variabilidad es $< 0,39\%$ para el mismo operador e instrumento y $< 1,26\%$ entre operadores e instrumentos diferentes. Los valores de este parámetro se correlacionan de forma excelente con los del Índice de Peróxidos en la mayoría de grasas.

3.6. - Índices de oxidación secundaria

La formación de compuestos secundarios de oxidación a partir de los hidroperóxidos de los ácidos grasos, así como a partir de otros compuestos secundarios de oxidación, lleva a una mezcla de numerosas especies químicas diferentes, cuya abundancia relativa depende de diversos factores. Entre estos factores destacan: la propia naturaleza de la grasa, especialmente su composición en ácidos grasos, el tratamiento o tratamientos sufridos por la grasa, y la presencia de antioxidantes y/o prooxidantes.

Como consecuencia, son muchos los métodos que han sido propuestos para evaluar el grado de oxidación secundaria de las grasas y aceites, con una significación claramente diferenciada, ya que el conjunto de sustancias a las que es sensible cada método es también claramente diferente. Entre estos Índices destacaremos y comentaremos sobre todo tres de ellos que son los más útiles. Como se ha comentado anteriormente, al hacer referencia a los valores de peróxidos en grasas y aceites, la determinación de algún Índice de oxidación secundaria es prácticamente obligada, en combinación con la determinación de peróxidos, para tener una idea adecuada del grado de alteración y calidad que presenta la muestra.

Índice de p-anisidina

Una buena alternativa, especialmente para los aceites vegetales, es el Índice de p-anisidina (AOCS Method Cd 18-90; IUPAC 7th ed Method 2.504; ISO 6885:2006). Su

fundamento es la formación de una base de Schiff coloreada en amarillo entre este reactivo y el grupo carbonilo de diversos compuestos presentes en el aceite o grasa. No obstante, no está exactamente establecido el tipo de compuesto carbonílico que da preferentemente esta reacción, aunque algunos autores postulan que los 2-alquenos son los responsables mayoritarios de la misma, debido a que la disposición de dobles enlaces conjugados en estos aldehidos aumenta la intensidad de la absorción. De cualquier modo, como la abundancia de estos compuestos, así como de otros carbonilos, depende de la composición en AG, la intensidad de la reacción dependerá sobre todo de la naturaleza de la grasa, aparte de del grado de oxidación. Así, las grasas monoinsaturadas darán menor respuesta que las ricas en linoleico y éstas menor respuesta que las ricas en linoléico. El procedimiento es muy simple y consiste en disolver la muestra en isooctano o n-hexano (entre 0,5 y 4,0 g de grasa/25 mL, según grado de oxidación) y realizar una lectura a 350 nm. Añadir luego la solución de p-anisidina (0,25% en ácido acético glacial) a una alícuota de la solución anterior y, después de 10 minutos, leer la absorbancia a 350 nm. El Índice de p-anisidina (IA) se calcula a partir de estas dos absorbancias

$$IA = 25 (1,2 A_R - A_0) / p$$

donde p = peso de grasa; A_R = absorbancia después de añadir el reactivo; A_0 = absorbancia inicial de la solución grasa.

Índice del ácido tiobarbitúrico (TBA)

Esta prueba es quizás la más utilizada para la evaluación de la oxidación secundaria en grasas animales y aceites de pescado, así como en la fracción lipídica de muchos alimentos y tejidos biológicos. El método se basa en la reacción del malondialdehído con dos moléculas de ácido tiobarbitúrico en medio ácido, para dar un derivado que presenta coloración rosada, con un máximo de absorbancia a 535 nm (AOCS Method Cd 19-90). El malondialdehído se forma preferentemente en grasas que contienen AG de elevado número de dobles enlaces, mientras que su proporción frente al resto de compuestos de oxidación es baja para grasas oleicas. No obstante, la reacción no es totalmente específica y existe aún hoy una gran controversia sobre qué tipo de compuestos participan además del malondialdehído en la reacción. Esto ha llevado a que el índice sea más conocido en la actualidad como *Índice de TBARS*, es decir, de sustancias reactivas frente al TBA. Varios factores hacen que la reacción se comporte de forma variable según el sustrato y que sean muy numerosos los trabajos que recoge la bibliografía que discuten las condiciones idóneas de aplicación para cada muestra. Entre estos factores hay que considerar la composición en ácidos grasos de la muestra, la acidez del medio, la presencia de Fe y otros

metales catalizadores de la oxidación, y la presencia de antioxidantes. Grau et al. (2000) estudiaron los factores que afectan la reacción y propusieron un método que determina muy selectivamente el malondialdehído, por medida de la segunda derivada.

Trienos conjugados

De la misma forma que los peróxidos lipídicos son dienos conjugados y la determinación de éstos en un aceite es un buen índice de la oxidación primaria, muchos compuestos secundarios formados por degradación de los peróxidos poseen estructuras de trieno conjugado (TC) (EEC No 2568/91). Estos compuestos son, preferentemente, dicetonas etilénicas, alcadienales o cetodienos conjugados, cuyo máximo de absorbancia característico se localiza alrededor de 270 nm. Si se registra el espectro de absorción de la grasa en solución, entre 200 y 350 nm, la absorbancia a 232 nm nos dará el % DC (oxidación primaria) y la absorbancia a 270 nm nos dará el % TC (oxidación secundaria). También es posible encontrar estructuras de tetraeno conjugado, con máximos de absorción localizados hacia 303 nm, pero su proporción es muy baja en casi todos los casos, lo que disminuye demasiado la sensibilidad de la medida. Las mismas interferencias y problemas descritos para la medida del % DC pueden aplicarse a esta determinación de la oxidación secundaria a través del % TC.

Una solución, cuando los índices anteriores no se muestran eficaces, es la determinación cuantitativa e individualizada de los compuestos volátiles de oxidación secundaria. Ésta es la mejor manera de determinar los componentes originados en el enranciamiento que se detecta de forma sensorial. Estos compuestos volátiles proceden de la destrucción de los peróxidos lipídicos y por ello son excelentes indicadores de cómo se ha desarrollado la oxidación en el seno de una materia grasa. El método más utilizado en la actualidad para esta determinación es la cromatografía de gases con la técnica del espacio en cabeza. La aplicación de esta técnica presenta numerosas ventajas en aceites destinados al consumo humano, aunque quizás en el caso del control de grasas para piensos su uso esté poco justificado, excepto en el campo de la investigación. Otro punto crítico es la selección de los compuestos principales a determinar, ya que el número total de compuestos volátiles que se pueden formar es grande y, además, variable en relación a los AG insaturados que predominan en la grasa. Pero los componentes volátiles mayoritarios formados durante la oxidación secundaria de los ácidos grasos podrían reducirse a un número bastante limitado, entre ellos pentano, hexanal, propanal, 2,4-decadienal, como mayoritarios, y 2-hexenal, pentanol, heptanal, heptenal, octenal como minoritarios.

3.7. - % Polímeros de los triacilgliceroles

Para la determinación específica de los dímeros y otros polímeros de los TG, el método que ha alcanzado una mayor aplicación es la CLAE sobre fases de exclusión molecular. En las condiciones del método normalizado y recomendado por la IUPAC (Standard Method 2508, 1992), se obtiene una banda que contiene el conjunto de polímeros de todos los tipos presentes en las grasas de fritura, tanto oxidados como no oxidados. Los monómeros cíclicos de TG, así como los TG oxidados son coeluidos en la misma banda que los TG inalterados. Finalmente, aparecen a continuación las bandas correspondientes a los DG, MG y AG libres. El detector más utilizado es el refractométrico, por su universalidad. Las columnas utilizadas son de 30 cm x 0,77 cm d.i., rellenas con gel de poliestireno/divinilbenceno de 5 micras. La fase móvil utilizada es el tetrahidrofurano. El método presenta unas buenas características de precisión, para contenidos de polímeros >3% en la muestra. Para valores inferiores se recomienda usar el método propuesto por la asociación alemana (DGF Standard Method C-III 3d(00)), que añade una separación previa de los compuestos no polares por extracción en fase sólida (cartucho de silicagel), antes de la CLAE de exclusión molecular (Munster, 1988).

Esta determinación está adquiriendo cada día más aplicaciones, ya que es un método relativamente simple y robusto, y permite establecer las proporciones de un tipo de compuestos que suelen constituir la mayor fracción en peso dentro de los productos de degradación de una grasa. En muchos casos su formación transcurre paralela al proceso de oxidación, razón por la cual son excelentes indicadores de alteración en diversos tipos de materias grasas. Obviamente, es en los subproductos grasos donde encuentra mayores aplicaciones, ya que en muchos casos han existido procesos muy enérgicos de tratamiento y, además, en grasas muy poliinsaturadas (p.ej. aceites de pescado) su formación continúa a gran velocidad durante las etapas de almacenamiento. Volviendo al estudio comentado anteriormente, de Nuchi et al. (2009), aquellos co- y subproductos grasos que presentaron valores más altos de polímeros se correspondían con los que presentaron también valores más altos de peróxidos y de los Índices de p-anisidina y TBA, como eran los aceites de pescado (media de 2,1% polímeros) y los aceites reciclados de cocina (media de 9,2%). En todos los casos la correlación fue muy significativa para el total de muestras de todas las grasas.

3.8. - Índice de acidez

La significación de este parámetro es elevada en todos los casos, pues una acidez incrementada puede ser indicador de algún defecto en la materia prima o en los procesos de elaboración de la materia grasa. Este parámetro adquiere una importancia mayor aún

para los subproductos grasos, particularmente los aceites ácidos, en los que se convierte en un parámetro de constitución, al ser su elevada acidez una característica típica. Esta relevancia queda clara si volvemos a analizar los valores encontrados en el estudio de Nuchi et al. (2009), que nos muestra que los valores obtenidos para todos los tipos de co- y subproductos grasos eran muy variables dentro de cada categoría, indicando por lo tanto una escasa normalización de estas materias grasas respecto a su acidez. Así, por ejemplo, tanto para las grasas animales como para los aceites de pescado se hallaron valores de Índice de Acidez que oscilaron entre 0,5 y 50. Lo mismo sucedía para los aceites ácidos, para los que los ácidos libres son mayoritarios como constituyentes, con valores que oscilaban entre 80 y 191 para los de refinación química, y entre 103 y 201 para los de refinación física. En los aceites reciclados de cocina, donde la hidrólisis es un fenómeno catalizado, los valores de Índice de Acidez observados estuvieron entre 1,3 y 19,3. Todo ello refuerza la determinación de este índice como un parámetro clave, al menos para estos tipos de materias grasas y sus mezclas, teniendo en cuenta la repercusión que tiene la proporción de ácidos grasos libres sobre su digestibilidad y valor energético.

En general, la metodología más ampliamente introducida para determinar la acidez, por su sencillez y universalidad, es la acidimetría, que consiste en la valoración volumétrica utilizando soluciones normalizadas de álcalis. Es el denominado *Índice de acidez* o *Grado de acidez*, que únicamente se distinguen en la forma de expresar el resultado:

Índice de acidez = mg KOH para neutralizar 1 g de materia grasa

Grado de acidez = AG libres, expresados en % ác. oleico

En algunos casos, según la naturaleza de la materia grasa se puede expresar el grado de acidez en % de palmítico, láurico u otro ácido graso que sea predominante en la grasa o aceite evaluado.

Existen diferentes procedimientos normalizados, que difieren en algunos detalles únicamente (AOAC 18th ed Official Method 940.28, IUPAC 2.201). La valoración debe realizarse siempre con una solución etanólica de KOH, mientras que la materia grasa a valorar debe disolverse en un disolvente adecuado. Existen dos tipos de procedimientos propuestos, los que utilizan el etanol como disolvente y los que utilizan una mezcla de etanol y éter etílico (50:50 v/v). La elección del disolvente parece tener pocas repercusiones en el resultado, pero la solubilización depende de la naturaleza de la muestra, así como de una agitación continua y efectiva.

Generalmente, predominan los métodos que usan el etanol como disolvente único (sistema propuesto ya por Bishop et al. en 1922, que estableció también los sistemas indicadores más adecuados). Estos métodos tienen la dificultad de que, aunque los AG libres son solubles, los TG no, lo que provoca un sistema bifásico que requiere muchas precauciones para una buena reproducibilidad y exactitud en la determinación, ya que la observación del punto final es compleja. Para la determinación del punto final es más recomendable un sistema potenciométrico, ya que la coloración propia de muchas materias grasas puede dar lugar a errores en la utilización de los indicadores visuales de coloración. En el caso de utilizar estos indicadores, el más recomendado es la fenolftaleína, aunque algunos autores sugieren que se obtienen puntos finales más exactos con la timolftaleína y el azul de timol. El cuadro 1 recoge un resumen de los principales métodos propuestos con sus características (Rossell, 1986; Mehlenbacher, 1977).

Cuadro 1.- Características de diferentes métodos para la determinación de la acidez libre.

Método	Muestra	Peso (g)	Disolvente	Indicador
AOCS	Todas las grasas, excepto secantes	3,5-56,4	Alcohol etílico	Fenolftaleína
AOCS	Aceites secantes	1,0-20,0	Isopropanol-Tolueno	Fenolftaleína
AOAC	Todas las grasas	7,05-56,4	Alcohol etílico	Fenolftaleína
NCPA	Aceites vírgenes vegetales	7,05	Alcohol etílico	Fenolftaleína
BSI-1	Todas las grasas, excepto las de BSI-2	2,0-50,0	Alcohol-Benceno (2:1)	Fenolftaleína
BSI-2	Lanolina, aceites oxidados y polimerizados	2,0-50,0	Agua caliente	Timolftaleína o Azul alcalino 6B
IFC	Todas las grasas	5-10	Eter etílico-Alcohol	Fenolftaleína
Ames y Licata	Todas las grasas	10	Benceno-Isopropanol-Agua (50:49.5:0.5)	Fenolftaleína/ isopropanol

3.9. - Porcentaje de ácidos grasos libres, mono, di y triacilgliceroles.

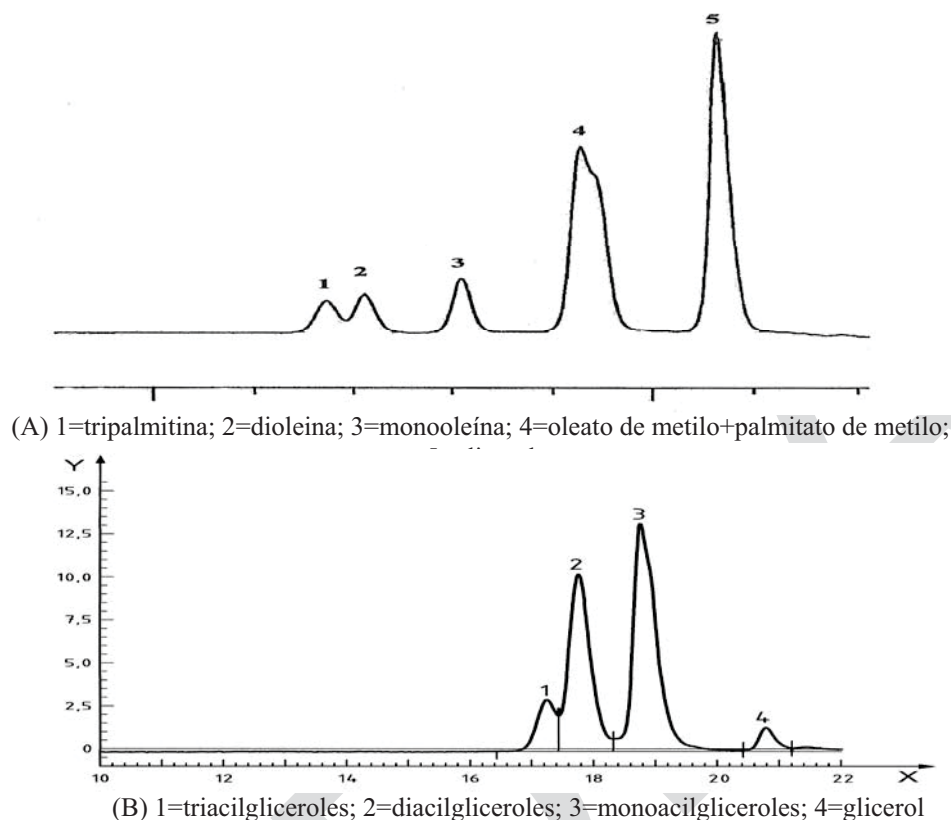
Esta metodología puede permitirnos un conocimiento más completo de las proporciones de las fracciones de AG que se hallan en sus diferentes formas. Como ya se ha comentado, esta información puede tener un interés creciente en el campo de las grasas para piensos, especialmente para co- y subproductos grasos y sus mezclas. Por ejemplo, los aceites ácidos o “grasoleínas” tienen una composición poco conocida y que en realidad puede ser bastante variable según su origen y proceso tecnológico. La acidez libre es un parámetro básico, pero haría falta además conocer como se hallan las otras fracciones de AG, como son los MG, DG y TG. Estas proporciones son variables en estos subproductos, al igual que en mezclas en que puedan utilizarse monoglicéridos como ingredientes, etc. Ya se comentó que las repercusiones desde el punto de vista de la digestibilidad de una grasa pueden ser importantes, ya que algunos de estos componentes pueden mejorarla.

Existen diversos métodos para llevar a cabo esta determinación, pero los más adecuados serían los de CLAE que utiliza columnas de exclusión molecular. Esta metodología es ya la de referencia para separar y cuantificar los polímeros de los TG y su aplicación a las fracciones de hidrólisis de los TG está alcanzando una gran aplicación en la industria de tecnología de las grasas, particularmente para el control de los biocarburantes, glicerol y de los productos de transesterificación.

Los procedimientos más utilizados (Darnoko et al., 2000; ISO 18395:2005) consisten en la preparación de la muestra grasa, que es muy simple, y la inyección en el cromatógrafo líquido equipado con columnas de exclusión molecular. Usualmente se trabaja con dos o tres columnas de Phenogel en serie y el eluyente cromatográfico es, en todos los casos, el tetrahidrofurano. El detector más habitual es el refractométrico. Como puede observarse en los cromatogramas de la figura 2, la separación presenta pequeñas diferencias entre ambos métodos, que dependen del tamaño de partícula y de poro del relleno de la columna. Así, dependiendo del problema analítico que se nos presente, podemos acoplar columnas de diferente tamaño de poro para resolver muestras de carácter diferente. Por ejemplo no es lo mismo el caso de los aceites ácidos, que presentan muchos AG libres y menos % TG, que los aceites y grasas puros, con muy escasa acidez libre y con mayoría de TG en su composición.

El método es simple de practicar y muy robusto, tal como demuestran los valores de repetibilidad y reproducibilidad interlaboratorio, tanto para diferentes patrones como para muestras de grasa (Norma ISO 18395:2005).

Figura 2.- Separación por CLAE de exclusión molecular de patrones de TG, DG, MG, AG y glicerol: (A) Darnoko et al., 2000; (B) Norma ISO 18395.



3.10. - Índice de yodo e Índice de saponificación

Se expresa como *los gramos de yodo que son fijados por cada 100 gramos de la grasa* y es, por lo tanto, un valor relacionado con el grado de insaturación total de la misma, ya que el yodo sólo puede fijarse en los dobles enlaces. No obstante, la reacción es lenta y deben tomarse medidas para que sea cuantitativa y reproducible. Existen diversos métodos, que utilizan diversos reactivos, entre los cuales el método de Wijs es el más utilizado en la actualidad como método recomendado (AOAC 18th ed Official Method 993.20). Emplea el cloruro de yodo como reactivo, que debe añadirse en exceso, y dejar reaccionar durante una hora como mínimo y en oscuridad. El exceso de yodo se valora finalmente con una solución normalizada de tiosulfato sódico. Existen modificaciones que intentan mejorar la rapidez, como las que utilizan catalizadores (sales mercurícas) cuando es deseable una determinación rápida a pie de línea de fabricación. En general, es un índice de interés para la evaluación rápida de la calidad de grasas semisólidas, tanto de origen animal, como vegetal o transformadas. En otros campos es un índice de escaso valor, ya que los aceites vegetales, p. ej., presentan escasas diferencias en su valor de índice de yodo (cuadro 2) y, además, la determinación de la composición en AG (CG) suministra una

información de mayor utilidad. En el caso de las grasas para piensos puede tener un cierto valor en relación con la mayor digestibilidad de los AG insaturados respecto a los saturados, aunque es difícil realizar una relación matemática entre ambos factores, ya que existen otras características estructurales de un AG insaturado que pueden disminuir su digestibilidad.

Cuadro 2.- Valores característicos del Índice de yodo y del Índice de saponificación para aceites y grasas comunes

	Índice de yodo	Índice de saponificación
Oliva	75-94	184-196
Soja	125-138	188-195
Girasol	120-134	188-193
Cacahuete	85-100	186-196
Colza	97-108	170-180
Maíz	103-128	187-193
Cacao	33-40	192-200
Coco	7,5-10,5	250-264
Palma	44-54	195-205
Sebo	38-42	192-198
Manteca	52-77	190-202
Sardina	160-190	185-194

Como puede deducirse de los valores del Índice de yodo que se recogen en el cuadro 2, el valor del mismo sólo presenta diferencias claras para grasas con composiciones muy extremas de ácidos saturados (coco, sebo, palma) o de ácidos poliinsaturados (pescado). Por ello, la utilización de este valor en el cálculo del valor energético queda reducido a estas grasas, pero es difícil de universalizar su aplicación. Aun menor es la aplicación del Índice de saponificación, por idénticas razones. Como reflejan los valores del cuadro 2, aun son más pequeñas las diferencias que se observan para este índice entre diferentes aceites y grasas. Por estas razones, la práctica de este índice (AOAC Method 920.160; AOCS Method Cd 3-25) está hoy en día casi en desuso. Los problemas de aplicación, tanto del Índice de yodo como del de saponificación, son obviamente aún mayores para sub- o coproductos grasos y en mezclas.

3.11. - Composición en ácidos grasos

Esta determinación se ha convertido en la actualidad en práctica fundamental e imprescindible para la caracterización de la fracción glicerídica de los alimentos o de las grasas y aceites, debido a que la diversidad de ácidos grasos y las proporciones de los mismos que pueden encontrarse constituyen un muy buen instrumento para la caracterización. En el caso que nos ocupa, es una determinación imprescindible y que vendría a sustituir a los Índices de yodo y saponificación, ya que nos permite conocer las proporciones individuales de cualquier ácido graso, así como las proporciones de diferentes fracciones (saturados, monoinsaturados, diinsaturados, etc). Ello nos puede permitir establecer ecuaciones para el cálculo del valor energético muy ajustadas a la composición de cada materia grasa. Como se comentará más adelante, también nos puede servir para establecer el total de AG digeribles de una grasa, excluyendo los que están formando parte de moléculas no digeribles.

Normalmente, esta determinación se realiza mediante cromatografía de gases previa interesterificación de los TG con el fin de obtener los ésteres metílicos de los ácidos grasos. Los ácidos libres presentan una polaridad excesiva que comportaría una elución demasiado lenta o incluso nula. El procedimiento consta, para las muestras de materias grasas, de las siguientes etapas:

- Transesterificación, con objeto de conseguir la formación de ésteres metílicos.
- Extracción de los ésteres metílicos de los AG con hexano/solución saturada de NaCl.
- Separación de la fase hexánica y deshidratación de la misma con sulfato sódico anhidro.
- Inyección del extracto en el cromatógrafo de gases, equipado con un detector universal de ionización de llama de hidrógeno (FID), y en condiciones cromatográficas variables para una adecuada separación de los AG.
- Identificación de los picos de los AG.
- Cuantificación de los picos de los AG.

La fase de obtención de los ésteres metílicos de los AG es quizás la más crítica de todo el procedimiento, y quizás por ello es aquella para la que se han propuesto más alternativas. Como simplificación podríamos decir que la transesterificación con metanol en medio alcalino es más rápida pero tiene el riesgo de dejar AG sin metilar, con lo que se perdería una cierta fracción sin determinar. La segunda alternativa es la metilación en medio ácido, que es más lenta pero asegura una transmetilación completa de los AG libres

y jabones. Diversos autores han estudiado el proceso y realizado propuestas para asegurar una completa metilación, en muchos casos en dos etapas, primero en medio alcalino con metanol/metóxido de sodio y, a continuación, en medio ácido con trifluoruro de boro/metanol (Craske et al., 1988; Schwartz y Gadjeva, 1988; Fourie y Basson, 1990; Guardiola et al., 1994).

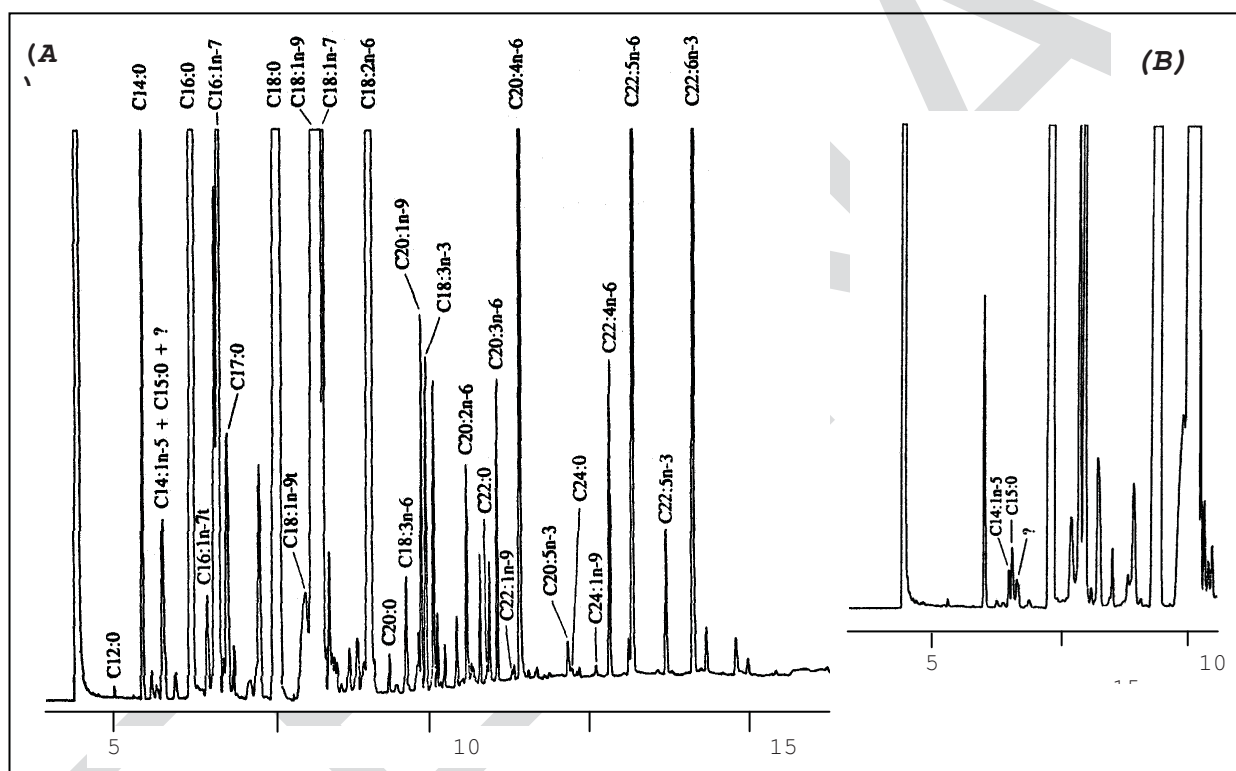
La separación de los ácidos grasos, es un claro ejemplo de la complejidad que puede presentarse en el campo de la cromatografía de gases aplicada a los piensos y alimentos, ya que en una materia grasa pueden encontrarse más de cincuenta ácidos distintos (o valores muy superiores como en el caso de las grasas lácteas) cuya detección y cuantificación puede ser de gran interés. Las condiciones de separación pueden ajustarse de forma precisa a partir de los siguientes parámetros cromatográficos: a) polaridad de la fase estacionaria; b) espesor de la fase estacionaria; c) longitud y diámetro de la columna; d) naturaleza de la fase móvil; e) velocidad del flujo de la fase móvil; y f) programación de la temperatura del horno. La figura 3 muestra cómo puede modificarse la resolución mediante diferentes programas de temperatura que, junto con la polaridad de la fase estacionaria, se convierte en parámetro fundamental en la consecución de resoluciones adecuadas.

Identificación. Lógicamente, la identificación de los ácidos grasos sobre el cromatograma obtenido es una etapa fundamental del proceso analítico. Esta identificación se consigue, inicialmente, por coincidencia de tiempos de retención en relación con los de patrones puros de los AG inyectados en condiciones idénticas y, en casos de duda, mediante cocromatografía (inyección de muestra de problema adicionada de patrón), observando en este caso el aumento y simetría del pico resultante. La figura 3 muestra una separación característica de los ácidos grasos de la fracción lipídica del huevo, en la que pueden observarse que algunas bandas presentan asimetría, lo que parece indicar el solapamiento de dos ácidos, situación que exigiría la modificación de las condiciones cromatográficas. Existen algunas técnicas adicionales que permiten obtener mayor información sobre la naturaleza de los ácidos grasos objeto de análisis, como son por ejemplo, la hidrogenación o la ozonólisis previas (con el fin de conocer la presencia de insaturaciones y su posición) y obviamente, la utilización conjunta de la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas.

Cuantificación. Básicamente, existen dos formas de cuantificación y de expresión de los resultados. La primera y más frecuente, es la denominada “normalización interna”. Se trata de un procedimiento muy simple que no exige calibrado. Consiste en expresar los resultados en porcentaje de cada AG, no con respecto al peso de la muestra sino en relación con el total de los ácidos grasos separados. Requiere únicamente, por tanto, sumar

las áreas de todos los ácidos grasos y dividir cada área individual por este valor. La única fuente de error que debe controlarse es la que deriva de la diferente respuesta de los distintos AG (debida fundamentalmente a distintas longitudes de cadena) frente al detector FID. Este problema puede solventarse mediante la utilización de los denominados factores de respuesta que multiplicados por el valor de cada área, corrigen el resultado.

Figura 3.— Separación obtenida por CG para los ésteres metílicos de los ácidos grasos del huevo (A), y detalle del cromatograma en la zona del pico correspondiente a C14 y C15, para resolver una banda compleja (B).



*Los cromatogramas se obtuvieron con una columna capilar (50 m · 0,25 mm) de fase estacionaria 100% cianopropil silicona (0,2 micras de espesor) y con los programas de temperatura siguientes: (A) 11,2 min a 177°C, de 177°C a 225°C a 7°C/min, i 11 min a 225°C; (B) 1 min a 170°C, de 170°C a 210°C a 3°C/min, 2 min a 210°C, de 213°C a 230°C a 7 °C/min, i 7 min a 230°C.

Otra forma de cálculo es la cuantificación mediante el sistema clásico de construcción de una recta de calibrado para cada AG. En este caso se requiere la utilización de un “patrón interno” (a veces dos, dependiendo de la longitud del cromatograma). En el caso de las grasas para piensos y el establecimiento del valor energético, el uso de los valores de normalización interna no es recomendable y es exigible una cuantificación exacta con el uso de calibración con patrón interno.

Pero hay que tener siempre muy presente que todas las condiciones implicadas en cada una de las etapas antes comentadas pueden alterar los resultados cuantitativos obtenidos. Así, no es poco frecuente el caso de resultados divergentes obtenidos por laboratorios diferentes sobre las mismas materias grasas, particularmente por lo que hace referencia a los AG minoritarios. Por esta razón, no sólo el uso de procedimientos muy estrictamente normalizados es absolutamente necesario, sino también es muy necesario realizar una adecuada validación de nuestro procedimiento, así como controlar la calidad y la posible variabilidad de composición de los reactivos utilizados. Aunque existen metodologías oficiales para cubrir esta determinación (AOAC 18th ed Official Method 969.33/963.22; IUPAC 7th ed Method 2.301.7/2.302; EEC No 2568/91), son bastante complejas y emplean en ciertos casos todavía columnas de relleno. Por ello, es más recomendable seguir procedimientos propuestos y validados por diferentes autores que se adapten más a nuestra conveniencia particular (Guardiola et al., 1994).

3.12. - % Ácidos grasos totales y por fracciones

Con fines de etiquetado nutricional de alimentos, la FDA ha definido el % de grasa digerible presente en un alimento como “la suma total de AG determinados en la fracción lipídica de un alimento, expresado como moléculas de TG”. Así, ha sido propuesto y validado un nuevo método (AOAC 18th ed Official Method 996.06; AOCS Method Ce 1h-05) de determinación del total de AG como TG, que puede substituir a los de gravimetría clásicamente utilizados para determinar el extracto etéreo total (Schmidt et al., 1995). Este método tiene la ventaja de que nos permite calcular, a partir de los valores de los AG individuales separados, no sólo un valor total que correspondería al total de energía lipídica digerible, sino también establecer los % de grasa saturada, monoinsaturada, diinsaturada, etc. La expresión en forma de TG y no de AG es obligada, pues el valor energético debe incluir también la fracción de glicerol. Así, a partir de una única determinación de la composición en AG podríamos establecer varios valores que nos pudieran interesar, como serían valores individuales (de ácido linoleico, palmítico o de cualesquiera otros AG), valores conjuntos para cada una de las diferentes clases de AG y, finalmente, el % total de grasa digerible (generadora de energía).

El método de la AOAC 996.06 es aplicable a alimentos, en los que se procederá a una extracción previa de la grasa, o a aceites y grasas directamente. El procedimiento evita la necesidad de realizar una recta de calibración para cada AG, utilizando la adición inicial de un patrón interno de un TG (triundecanoína, que contiene 3 unidades de C11:0) y calculando todos los resultados (TG totales, TG saturados, etc) por referencia al peso de este patrón interno utilizado, aplicando los factores de respuesta de cada AG calculados a partir de la solución utilizada de cada AG para su identificación sobre el cromatograma. El

método incluye una lista de los factores de transformación que deben utilizarse para transformar las cantidades de cada ester metílico de AG a las cantidades equivalentes en TG.

3.13. - Posición de los ácidos grasos en los acilgliceroles

Esta determinación presenta interés en la caracterización de grasas y aceites con orígenes distintos, que si bien pueden poseer una composición en ácidos grasos semejante, podrían presentar una distribución diferente de los mismos en las distintas posiciones del glicérido. Así, por ejemplo, en la norma europea que regula los aceites de oliva y sus métodos de análisis (EEC Regulation No 2568/91) se señala que el porcentaje de AG saturados en la posición sn-2 no puede superar un determinado valor como índice de caracterización y pureza. En el caso que nos ocupa, como ya se ha discutido en el apartado 2, esta determinación puede ser de interés nutricional en el uso de grasas en piensos, ya que la digestión con lipasas libera los AG de las posiciones extremas, pero deja intactos los 2-MG y éstos tienen una absorción fisiológica favorecida respecto a los AG libres. Esta información no puede obtenerse, por el contrario, mediante los métodos habituales de determinación de TG individuales, ya que estos métodos (cromatografía de gases o cromatografía líquida) nos diferencian TG tipo, pero no son capaces de separar TG que contienen los mismos 3 AG pero en posiciones cambiadas.

La metodología utilizada usualmente (EEC Regulation No 2568/91; IUPAC method 2.210; UNE 55079) para resolver esta cuestión es la que se fundamenta en la hidrólisis selectiva de TG mediante lipasas en el laboratorio. Estas enzimas provocan la hidrólisis del enlace éster de las posiciones 1 y 3, originando por tanto como producto de reacción los 2-MG por un lado y, por otro, los ácidos grasos libres que estaban antes en las posiciones sn1 y sn-3 de los diferentes TGs. Separando a continuación selectivamente la fracción de los 2-MG podemos analizar los AG que se hallaban en la posición sn-2 de los TG. El procedimiento establecido en los métodos oficiales, consta de las siguientes etapas: a) la muestra de aceite o grasa convenientemente acondicionada (neutralizada y eliminados los jabones) se somete a la acción de la lipasa pancreática en un medio de pH 8 con trishidroximetano, cloruro cálcico y colato de sodio; b) se realiza una extracción con éter etílico; c) se fracciona la solución etérea mediante cromatografía en capa fina utilizando como eluyente una mezcla de éter de petróleo/éter etílico (2:1) adicionada de un 1,6% de ácido fórmico; d) se rasca selectivamente la banda correspondiente a los 2-MG sobre la cromatoplaque y se somete el extracto de la misma a metilación (por calefacción a reflujo con metilato sódico durante 5 min), se neutraliza con HCl y se vuelve a calentar; e) se extrae con 1 mL de hexano; g) se inyecta en el cromatógrafo la solución hexánica; h) se calcula el porcentaje de cada AG mediante normalización interna. Estos valores se

comparan con los obtenidos para la determinación de los % de cada AG en la grasa total y, por diferencia, pueden estimarse los % de cada AG que se hallaban dispuestos en la posición sn-2 y la suma de los que se hallaban en posiciones sn-1 y sn-3. Obviamente, la exactitud de esta determinación tiene algunos problemas, debidos por una parte a la incompleta hidrólisis que pueda obtenerse tras el tratamiento con lipasas y, por otra parte, a que existe una cierta acción traslocadora de las lipasas, que puede intercambiar la posición de algunos AG en los TG, aunque en una pequeña proporción. Sin embargo, el error se considera asumible, dado que la elevada magnitud de los valores de % de AG disminuye bastante el posible error.

3.14. - % Fosfolípidos

La determinación de fosfolípidos sólo tiene interés en aquellos aceites vegetales puros que presentan una cierta fracción de componentes fosfoglicerídicos o bien en mezclas en las que las lecitinas sean un ingrediente identificado. El principal interés del contenido en fosfolípidos es, como se ha discutido en el apartado 2, por su acción emulsionante, que incrementa la solubilización y la formación de micelas grasas en el tracto digestivo, por lo que aumentaría la digestibilidad global de la grasa y de los ácidos grasos más hidrófobos (p.ej. saturados de cadena larga) en particular. Además, los fosfolípidos tiene un valor nutricional elevado, ya que presentan altas proporciones de AG poliinsaturados.

La determinación más imple es la que utiliza la nefelometría o turbidimetría (AOCS Method Ca 19-86). El procedimiento se basa en la insolubilidad de los fosfolípidos en una mezcla de la grasa con acetona. Por lo tanto, tratando la muestra grasa con una proporción adecuada de acetona, la turbidez final obtenida será proporcional al nivel de fosfolípidos presente. La medida se realiza en unidades turbidimétricas NTU. Usualmente, la calibración de esta medida se realiza a partir de los factores de equivalencia de esta unidad turbidimétrica con los correspondientes mg de fósforo, trabajando con una serie de muestras de aceites cuyo contenido en fósforo se determinó previamente por colorimetría. La única limitación del método se presenta para las muestras que contengan una cierta proporción de jabones.

La alternativa a este método es la aplicación de métodos que determinan directamente el contenido de fósforo elemental, bien por métodos colorimétricos (AOCS Ca12-55; AOCS Ca 12a-02) o por métodos de espectrometría de emisión (AOCS Ca 20-99) o de absorción atómica con horno de grafito (AOCS Ca 12b-92).

4.-CONCLUSIONES

Como resumen de los comentarios específicos realizados anteriormente para los diversos parámetros de control analítico de las grasas, se podría concluir que existen algunos valores de composición química que resultan imprescindibles para tener una primera información básica sobre el valor nutricional/energético de las mismas. En primer lugar, sería necesario obtener información bastante aproximada de cuál es el % de grasa realmente digerible. Ello podría calcularse indirectamente, sustrayendo del total de la grasa los contenidos de componentes no energéticos, como serían MIU+polímeros (parámetros 3.1, 3.2, 3.3 y 3.7); o bien a través de la suma del parámetro “% materia no eluible” (3.4) más el % insaponificable (3.1). Como ya se ha discutido anteriormente, el aspecto más controvertido o de determinación más compleja es el de los compuestos de oxidación de los AG. Aquí el analista debe tomar decisiones que dependerán del tipo de grasa y, en general, para grasas puras bien conservadas podría suprimirse esta determinación sin grandes problemas. De hecho la mayor parte de los peróxidos lipídicos ya habrán sido tenidos en cuenta dentro del valor de “% impurezas insolubles” o en el valor de “% materias no eluibles”. Sólo en el caso de grasas que hayan sufrido procesos de obtención más agresivos o en mezclas de origen no bien conocido, o cuando se desconozca el estado de conservación, deberemos hacer alguna determinación referente a la oxidación. La mejor elección sería casi siempre la determinación del Índice de peróxidos, acompañada de algún Índice de oxidación secundaria. Esta doble determinación nos permite conocer de forma más detallada el estado de alteración real de la grasa.

En lugar de proceder de forma indirecta, restando de la grasa los valores de los parámetros relativos a componentes no energéticos, podría procederse al cálculo de forma directa del % total de AG que están inalterados y son digeribles, a través de la determinación de la composición en AG, que expresa el resultado como TG (parámetro 3.12). A partir de este valor de partida, tanto calculado directa como indirectamente, podemos ahora evaluar algunas propiedades más concretas que influirán también de diferente forma en el valor nutritivo de la grasa, favoreciendo o disminuyendo la digestibilidad y absorción de los AG en el tracto digestivo del animal. Un primer factor es el grado de insaturación de los AG, que puede evaluarse a través de la misma determinación anteriormente propuesta (3.11 ó 3.12 que son similares) que nos permite conocer el contenido individual de los AG mayoritarios (palmítico, oleico, linoleico, etc), o bien calcular el contenido de cada clase, como podrían ser % de saturados, % de monoinsaturados, % de diinsaturados, etc. La alternativa clásica del Índice de yodo para evaluar la insaturación global continúa siendo posible, pero ya se comentó lo discutible que puede ser la significación de este valor a nivel nutricional, por su escasa especificidad. Un segundo factor a tener en cuenta es la longitud de la cadena. También aquí volvemos a

insistir en aprovechar la determinación de la composición individualizada en AG que ya habremos realizado, para poder utilizar los porcentajes de algunos AG individuales o de la suma de algunos de ellos, que presentan una longitud especialmente corta o larga y que a veces pueden ser mayoritarios. En este punto es importante destacar que el disponer de los valores de AG individuales en la grasa nos permite ir hacia un concepto diferente y más exacto que es el uso de % de AG individuales, lo que reúne los dos factores de insaturación y longitud de la cadena en uno. Así, de esta forma, se pueden utilizar los valores de digestibilidad de ácidos grasos determinados que estén en una proporción destacable en la grasa y que presenten particularidades en su digestibilidad (esteárico, linoleico, láurico, etc).

Un último factor fundamental que afecta la digestibilidad es el % de AG que se hallan realmente en la forma de TG. El parámetro clásico en este caso es la determinación del “Índice de acidez”, que sigue siendo básico. Además, ya hemos comentado en el texto de forma más desarrollada que, cuando este valor sea alto (p.ej. para grasoleínas o sus mezclas), puede ser interesante conocer el % real de TG, DG y MG que constituyen la grasa, ya que no afectan del mismo modo la digestibilidad de la grasa. Esto podríamos determinarlo a través del parámetro 3.9. Por otra parte, los estudios nutricionales son cada vez más completos y el mercado de las grasas es también cada día más cambiante, lo que nos puede llevar en la actualidad o en un futuro próximo a la necesidad de determinar con mayor frecuencia otros parámetros que nos den información necesaria para matizar el valor nutritivo y la digestibilidad y absorción efectiva de determinadas grasas. Así, la adición de agentes emulgentes o la presencia de forma natural de ciertas proporciones de componentes de carácter emulgente (MG, DG, fosfolípidos) pueden mejorar la digestibilidad de una grasa, razón por la cual puede ser útil su determinación (parámetros 3.9 y 3.14). Además, sabiendo que la absorción de los AG es preferente en forma de 2-MG respecto a su forma libre, también podría ser interesante en determinadas grasas conocer el % de determinados AG (palmítico, esteárico, linoleico, etc) que se hallan situados en la posición 2 de los TG, puesto que serían absorbidos de forma preferente (parámetro 3.13).

5.- REFERENCIAS

- AOAC (2005) Oils and fats, Chapter 41. (Firestone, D., Yurawecz, M.P. eds.) *AOAC Official Methods of Analysis*, 18th ed. AOAC International, Gaithersburg, MD (USA).
- AOCS (2008) *Official Methods and Recommended Practices*, 6th edition. American Oil Chemists' Society, Champaign, IL (USA).
- BLANCH, A., BARROETA, A.C., BAUCCELLS M.D. y PUCHAL, F. (2000) *Archive für Geflügelkunde* 64:14-18.

- BOCKISCH, M. (1998) *Fats and Oils Handbook*. AOCS Press, Champaign, IL (USA).
- BOU, R., CODONY, R., TRES, A., DECKER, E.A. y GUARDIOLA, F. (2009) *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 49: 800-822.
- BRACCO, U. (1994) *Am. J. Clin. Nutr.* 60 (suppl), 1002S-1009S.
- COMMISSION REGULATION (EEC) No 2568/91 of 11 July 1991 on the characteristics of olive oil and olive-residue oil and on the relevant methods of analysis. *OJ L 248*, 5-9-1991, p.1 (1991)
- CRASKE, J.D., BANNON, C.D. y NORMAN, L.M. (1988) *JAOCs* 65, 262-271.
- DARNOKO, D., CHERYAN, M. y PERKINS, E.G. (2000) *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.* 23: 2327-2335.
- DECKER, E.A. (1996) *Nutr. Rev.* 54: 108-110.
- MUNSTER, F. R. *German Standard Methods for the Analysis of Fats and other Lipids*. English Edition of Deutsche Einheitsmethoden zur Untersuchung von Fetten, Fettprodukten, (DGF-Standard Methods). Determination of polymerized (di- and oligomeric) triglycerides content at low level (method C-III 3d (00)) CRC Pr I Llc, Boca Ratón, USA (1988)
- DOLZ, S. (1996) Utilización de grasas y subproductos lipídicos en monogástricos. XII Curso de especialización FEDNA, Madrid. <http://www.etsia.upm.es/fedna/publi.htm>
- FOURIE, P.C. y BASSON, D.S. (1990) *JAOCs* 67: 18-29.
- GARRET, R.L. y YOUNG, R.J. (1975) *J. Nutrition* 105: 827-835. GRAU, A., GUARDIOLA, F., BOATELLA, J., BARROETA, A. y CODONY, R. (2000) *J. Agric. Food Chem.* 48, 1155-1159
- GUARDIOLA, F., CODONY, R., RAFECAS, M., BOATELLA, J. y LÓPEZ, A. (1994) *J. Food Compos. Anal.* 39: 185-189.
- INNIS, S.M., DYER, R.A. y LIEN, E.L.. (1997) *J. Nutr.* 127: 1362-1370.
- INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY (1992) *Standard Methods for the analysis of oils and derivatives*. 1st supplement to the 7th edition. Blackwell Science Publications, Oxford.
- ISO 662:1998. *Animal and vegetable fats and oils. Determination of moisture and volatile impurities*.
- ISO 663:2007. *Animal and vegetable fats and oils. Determination of insoluble impurities content*,
- ISO 18395:2005. *Animal and vegetable fats and oils. Determination of monoacylglycerols, diacylglycerols, triacylglycerols and glycerol by high-performance size-exclusion chromatography (HPSEC)*.
- JORGENSEN, H., GABERT, V.M., HEDEMANN, M.S. y JENSEN S.K. (2000) *J. Nutrition* 130: 852-857.
- KARUPAIAH, T. y SUNDRAM, K. (2007) *Nutrition and Metabolism* 4: 16-33.
- KRITCHEVSKY, D. (1988) *Nutr. Rev.* 46: 177-181.

- KUBOW, S. (1996) *J. Nutrition Biochemistry* 7: 530-541.
- MATEOS, G.G., PIQUER, J. y GARCÍA, M. (1995) *Utilización de grasas y subproductos lipídicos en avicultura*. Memorias XIV Congreso Avicultura. Santiago de Chile, p. 42-50.
- MATEOS, G.G., REBOLLAR, P.G. y MEDEL, P. (1996) *Utilización de grasas y productos lipídicos en alimentación animal: grasas puras y mezclas*. XII Curso de especialización FEDNA, Madrid. <http://www.etsia.upm.es/fedna/publi.htm>.
- MEHLENBACHER, V.C. (1977) *Análisis de grasas y aceites*. Ediciones Urmo. Bilbao (España).
- MU, H. y HOY, C.E. (2004) *Progress in Lipid Research* 43: 105-133.
- MU, H. y PORSGAARD, T. (2005) *Progress in Lipid Research* 44: 430-448.
- NAVAS, J.A., TRES, A., CODONY, R., BOATELLA, J., BOU, R. y GUARDIOLA, F. (2004) *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 106: 688-696.
- NG W.K. y BAHURMIZ O.M. (2009). *Food Chem.* 113: 1041-1048.
- NUCHI, C.; GUARDIOLA, F., BOU, R., BONDIOLI, P., DELLA BELLA, L. y CODONY, R. (2009) *J. Agric. Food Chem.* 57 (5): 1952-1959.
- OZIMEK L, SAUER WC, KOZIKOWSKI W. y JORGENSEN H. (1984) *Agriculture & Forestry Bulletin*, 14-16.
- ROSSELL, J.B. (1986) Classical analysis of oils and fats. En *Analysis of oils and fats*. (ed. por Hamilton, R.J., Rossell, J.B.) Elsevier Appl. Sci. Barking (UK).
- SCHMIDT, R.H., MARSHALL, M.R. y O'KEEFE, S.F. (1995) Total fat (p. 29-56). En *Analyzing foods for nutrition labeling and hazardous contaminants* (ed. por I.J.Jeon y W.G. Ikins). Marcel Decker Inc., New York (USA).
- SCHWARTZ, D.P. y GADJEVA, D.G. (1988) *JAACS* 65: 378-380.
- TORTENSEN, B.E., FRØYLAND, L. y LIE, Ø. (2004) *Aquac. Nutr.* 10: 175-192.
- TUOMASJUKKA, S.S., VIITANEN, M.H. y KALLIO, H.P. (2009) *J. Nutr. Biochem.* 20: 909-915.
- UNE 55008: 1973. Materias grasas. Determinación de los ácidos grasos oxidados.
- WISEMAN, J. y LESSIRE, M. (1987). *Br. Poultry Sci.* 28: 677-691.
- WISEMAN, J. y SALVADOR, F. (1989) *Br. Poultry Sci.* 30: 653-662.
- WOOD, J.D., RICHARDSON, R.I., NUTE, G.R., FISHER, A.V., CAMPO, M.M., KASAPIDOU, E., SHEARD, P.R. y ENSER, M. (2003) *Meat Sci.* 66: 21-32.