

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL
CUSCO**

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUIMICA



“DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE 3,4 BENZOPIRENO POR HPLC Y GRADO DE ALTERACIÓN EN ACEITES Y MANTECAS COMESTIBLES SEGÚN EL TIEMPO DE REUTILIZACIÓN EN LA FRITURA EN CHICHARRONERÍAS Y POLLERÍAS DEL CENTRO HISTÓRICO DEL CUSCO”

**TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE:
QUÍMICO FARMACEUTICO**

PRESENTADO POR:

Br. Lechuga Noa, Víctor Eduardo

Br. Quehwarucho Acuña, Jimena

ASESOR:

Dr. Q.F. Nerio Gongora Amaut

“TESIS FINANCIADA POR LA UNSAAC”

CUSCO – PERU

2015

DEDICATORIA

A mis padres Vicente y Juana

Por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica, como de la vida, por su incondicional apoyo perfectamente mantenido a través del tiempo sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor.

A mis hermanos Elvis y Renzo.

Por los ejemplos de perseverancia y constancia que los caracterizan y que me ha infundado siempre, por el valor mostrado para salir adelante y por su amor, por estar conmigo y apoyarme siempre, los quiero mucho.

A mis familiares y amigos

Que tuvieron una palabra de apoyo durante mis estudios, y a mis angelitos Tía Rene y Lucía por cuidarme siempre desde el cielo.

Jimena Quehwarucho Acuña

AGRADECIMIENTOS

A Dios.

Por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.

A mi asesor de tesis, Dr. Q.F Nerio Góngora Amaut

Por su esfuerzo y dedicación, quien con sus conocimientos, su experiencia, su paciencia y su motivación ha logrado en mí que pueda terminar mis estudios con éxito.

A Víctor

Por el apoyo recibido desde el día que lo conocí, por ser más que un amigo, por ser como un hermano. Por todo el apoyo recibido para la realización de esta tesis.

A mis amigos.

Por su amistad incondicional y que hasta ahora, seguimos siendo amigos: Chio, Mabel, Ponchito por compartir los buenos y malos momentos, por haberme ayudado a realizar este trabajo.

Al código 2008-I

Que nos apoyamos mutuamente en nuestra formación profesional y por todas las experiencias vividas.

Son muchas las personas que han formado parte de mi vida profesional a las que me encantaría agradecerles su amistad, consejos, apoyo, ánimo y compañía en los momentos más difíciles de mi vida. Algunas están aquí conmigo y otras en mis recuerdos y en mi corazón, sin importar en donde estén quiero darles las gracias por formar parte de mí, por todo lo que me han brindado y por todas sus bendiciones.

Jimena Quehwarucho Acuña

DEDICATORIA

A Dios.

Por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.

A mis padres Julia y Víctor.

Por los valores que me han inculcado, y por haberme dado la oportunidad de tener una excelente educación en el transcurso de mi vida. Sobre todo por ser un excelente ejemplo de vida a seguir.

A mi hermana Angelita.

Por ser siempre una motivación para salir adelante, por su cariño, sus sonrisas y por todos los buenos momentos que me hace pasar.

Victor Eduardo Lechuga Noa

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco a Dios por haberme acompañado y guiado a lo largo de este camino, por darme siempre lo que merezco cuando lo necesito.

Le doy gracias a mis padres, por haberme apoyado en todo momento, por todo lo que me han dado y me han aguantado estos 23 años, pero infinitamente agradecerles por su inacabable amor hacia mi hermana y hacia mí. Los amo.

A Angie por darme el privilegio de verla crecer, y por dejarme ser su mejor amigo.

A mi compañera de tesis, Jimena, por ser una gran amiga, compañera confiable, increíble persona, y sobre todo por ser una hermana para mí.

A la helpitah por siempre darme motivos, ánimos y fuerzas para seguir adelante.

*A mis amigos, Paspantu, Ponchito, Piolin, Ginger, Pato Palomino, Renato, Luisa, Carmensita, Chio, Mabel, Lisbee, Edy, Cachupin, Dante, Alan, Yanina, Lia, Vania, Rony, etc... y a todo el código 2008-I por ser una parte muy importante de mi vida, por haberme apoyado en las buenas y en las malas y sobre todo porque **“UN CHOCCHO NUNCA MUERE”**.*

Al doctor Nerio Gongora por su por su esfuerzo y dedicación, quien con sus conocimientos, su experiencia, su paciencia y su motivación me ha sido de gran apoyo para esta investigación.

A los Químicos Janet Gonzales, Lourdes Galiano y Jorge Choquenaira por creer en nosotros, y habernos brindado la oportunidad de desarrollar la tesis con todo el apoyo y facilidades que nos fueron otorgadas.

Victor Eduardo Lechuga Noa

INDICE

| | |
|--|-------------|
| RESUMEN | VIII |
| SUMMARY | X |
| INTRODUCCION | 1 |
| CAPITULO I | 2 |
| GENERALIDADES | 2 |
| 1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA..... | 2 |
| 1.2. FORMULACION DEL PROBLEMA:..... | 4 |
| 1.3. OBJETIVO GENERAL:..... | 4 |
| 1.4. OBJETIVOS ESPECIFICOS..... | 4 |
| 1.5. LIMITACIONES:..... | 5 |
| 1.6. JUSTIFICACION:..... | 5 |
| 1.7. HIPOTESIS: | 8 |
| CAPITULO II | 9 |
| MARCO TEORICO CONCEPTUAL | 9 |
| 2.1. ANTECEDENTES..... | 9 |
| 2.1.1. ANTECEDENTES INTERNACIONALES:..... | 9 |
| 2.1.2 ANTECEDENTES NACIONALES: | 15 |
| 2.2. BASES TEORICO CIENTIFICAS | 16 |
| 2.2.1. DEFINICIÓN DE LÍPIDOS | 16 |
| 2.2.2. FRITURA: | 28 |
| 2.2.3. ALTERACIONES DE LOS LÍPIDOS EN EL PROCESO DE CALENTAMIENTO DE LAS GRASAS Y ACEITES..... | 33 |
| 2.2.4. CRITERIOS DE CALIDAD Y DETERIORO DE LAS GRASAS Y ACEITES | 40 |
| 2.2.4.1. ÍNDICE DE ACIDEZ..... | 42 |
| 2.2.4.2. ÍNDICE DE YODO | 44 |
| 2.2.5. AGENTES TÓXICOS GENERADOS DURANTE EL PROCESO DE FRITURA | 46 |
| 2.2.6. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAR HAPS EN ACEITES DE ORIGEN VEGETAL..... | 69 |
| 2.2.7. TEST QUÍMICOS RÁPIDOS DE DETECCIÓN DE CALIDAD..... | 75 |
| 2.2.8. CARACTERÍSTICAS SENSORIALES DE LOS ALIMENTOS FRITOS QUE DETERMINAN LA CALIDAD DEL ACEITE..... | 77 |

| | |
|---|------------|
| CAPITULO III | 81 |
| METODOS Y MATERIALES | 81 |
| 3.1. MATERIALES E INSTRUMENTOS DE LABORATORIO: | 81 |
| 3.2. DISEÑO METODOLÓGICO:..... | 82 |
| 3.2.1. NIVEL Y TIPO DE INVESTIGACIÓN:..... | 82 |
| 3.2.2. IDENTIFICACIÓN Y OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES:..... | 82 |
| 3.2.3. POBLACIÓN Y MUESTRA | 90 |
| 3.2.4. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN | 90 |
| 3.2.5. INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS..... | 91 |
| 3.3. PROCEDIMIENTO GENERAL | 93 |
| 3.3.1. RECOLECCIÓN DE MUESTRA:..... | 94 |
| 3.3.2. ANALISIS ORGANOLEPTICO: | 94 |
| 3.3.3. ANALISIS FISICO-QUIMICO | 96 |
| 3.3.4. DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS OXIDADOS : | 99 |
| 3.3.5. DETERMINACIÓN DEL 3,4 – BENZOPIRENO | 102 |
| CAPITULO IV | 108 |
| RESULTADOS | 108 |
| CONCLUSIONES..... | 136 |
| SUGERENCIAS | 138 |
| BIBLIOGRAFIA..... | 140 |
| ANEXOS..... | 152 |

INDICE DE TABLAS

| | |
|---|-----|
| Tabla N°1: Análisis de varianza de la concentración de 3,4 benzopireno por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)..... | 108 |
| Tabla N° 2: Prueba de tukey – tiempo de uso | 109 |
| Tabla N° 3: Prueba de tukey –establecimiento..... | 112 |
| Tabla N° 4. Relación entre el grado de alteración de las muestras según prueba colorimétrica de oxifrit- test y tiempo de uso de la muestra..... | 116 |
| Tabla N° 5. Distribución del color de las muestras de aceite y manteca utilizadas en la fritura en chicharronerías y pollerías del centro histórico del Cusco..... | 121 |
| Tabla N° 6. Relación entre el color de las muestras y el grado de alteración según prueba colorimétrica de oxifrit –test | 122 |
| Tabla N° 7: Distribución del olor de las muestras de aceite y manteca utilizadas en la fritura en chicharronerías y pollerías del centro histórico del Cusco..... | 123 |
| Tabla N° 8. Relación entre el olor de las muestras y el grado de alteración según prueba colorimétrica de oxifrit –test | 124 |
| Tabla N° 9. Distribución del aspecto de las muestras de aceites y mantecas utilizadas en la fritura en pollerías y chicharronerías del centro histórico del Cusco | 126 |
| Tabla N° 10. Relación entre el aspecto de las muestras y el grado de alteración según prueba colorimétrica de oxifrit –test | 127 |
| Tabla N° 11. Índice de acidez (% de ácido oleico) de las muestras usadas en chicharronerías y pollerías del centro histórico del Cusco | 129 |
| Tabla N° 12. Relación entre índice de acidez (% de ácido oleico) de las muestras usadas en chicharronerías y pollerías del centro histórico del Cusco y su grado de alteración. | 130 |
| Tabla N° 13. Índice de yodo de las muestras usadas en chicharronerías y pollerías del centro histórico del Cusco | 132 |
| Tabla N° 14. Relación entre índice de yodo de las muestras usadas en chicharronerías y pollerías del centro histórico del Cusco y su grado de | |

| | |
|-----------------|-----|
| alteración..... | 133 |
|-----------------|-----|

INDICE DE GRAFICOS

| | |
|---|-----|
| Gráfico N°1: Concentración de benzopireno de acuerdo al tiempo de uso de las muestras en chicharronerías y pollerías del centro histórico de Cusco..... | 109 |
| Gráfico N° 2: Concentración de benzopireno en las muestras tomadas de chicharronerías y pollerías del centro histórico de Cusco... .. | 111 |
| Gráfico N°3. Relación de la concentración de 3,4 benzopireno en aceites y mantecas comestibles según el tiempo de uso en chicharronerías y pollerías del centro histórico del Cusco..... | 113 |
| Gráfico N° 4. Relación entre el grado de alteración de las muestras según prueba colorimétrica de oxifrit- test y tiempo de uso de la muestra | 116 |
| Gráfico N° 5. Distribución del color de las muestras de aceite y manteca utilizadas en la fritura en chicharronerías y pollerías del centro histórico del Cusco..... | 121 |
| Gráfico N° 6. Relación entre el color de las muestras y el grado de alteración según prueba colorimétrica de oxifrit –test..... | 122 |
| Gráfico N° 7: Distribución del olor de las muestras de aceite y manteca utilizadas en la fritura en chicharronerías y pollerías del centro histórico del Cusco | 124 |
| Gráfico N° 8. Relación entre el olor de las muestras y el grado de alteración según prueba colorimétrica de oxifrit –test | 125 |
| Gráfico N° 9. Distribución del aspecto de las muestras de aceites y mantecas utilizadas en la fritura en pollerías y chicharronerías del centro histórico del Cusco | 126 |
| Gráfico N° 10. Relación entre el aspecto de las muestras y el grado de alteración según prueba colorimétrica de oxifrit –test | 128 |
| Gráfico N° 11. Índice de acidez (% de ácido oleico) de las muestras usadas en chicharronerías y pollerías del centro histórico del Cusco | 129 |

| | |
|---|-----|
| Gráfico N° 12. Relación entre índice de acidez (% de ácido oleico) de las muestras usadas en chicharronerías y pollerías del centro histórico del Cusco y su grado de alteración. | 131 |
| Gráfico N° 13. . Índice de yodo de las muestras usadas en chicharronerías y pollerías del centro histórico del Cusco | 133 |
| Gráfico N° 14. Relación entre índice de yodo de las muestras usadas en chicharronerías y pollerías del centro histórico del Cusco y su grado de alteración. | 134 |

INDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura N° 1. Ácidos grasos esenciales | 18 |
| Figura N° 2. Estructura del ácido eicosapentaenoico (EPA) y del ácido docosahexanoico (DHA) | 19 |
| Figura N° 3: Estructura de los ácidos grasos saturados e insaturados | 23 |
| Figura N° 4: Estructura química del colesterol. | 25 |
| Figura N° 5. Posibles alteraciones producidas en un sistema lipídico sometido a calentamiento..... | 33 |
| Figura N° 6. Reacción de hidrólisis de los triglicéridos..... | 36 |
| Figura N° 7. Mecanismos de las fases de las reacciones de oxidación..... | 38 |
| Figura N° 8. Influencia en el aceite de freír en la calidad del producto..... | 41 |
| Figura N° 9. Reacción de hidrólisis de triglicéridos. | 42 |
| Figura N° 10. Reacción de neutralización de los ácidos grasos para la determinación del índice de acidez..... | 44 |
| Figura N° 11. Reacciones químicas de halogenación..... | 46 |
| Figura N° 12. Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos | 48 |
| Figura N° 13. Estructura química del 1-2-5-6-dibenzantraceno. | 51 |
| Figura N° 14. Estructura química del 8-metil-3-4-benzopireno..... | 52 |
| Figura N° 15. Estructuras químicas de 1,2-benzopireno, colantreno y metilcolantreno..... | 52 |
| Figura N° 16. Metabolismo hepático del benzo(a)pireno. | 61 |

| | |
|---|-----|
| Figura N° 17. Esquema de un equipo de HPLC..... | 72 |
| Figura N° 18. Estimación visual de la coloración resultante en el kit del Oxifrit-test..... | 77 |
| Figura N° 19. Cromatogramas de estándar de Benzopireno y una muestra de manteca de chicharronería..... | 118 |
| Figura N° 20. Cromatogramas de estándar de Benzopireno y una muestra de aceite de pollería..... | 119 |

INDICE DE CUADROS

| | |
|--|-----|
| Cuadro N° 1: Clasificación de los Lípidos de acuerdo a su estructura..... | 21 |
| Cuadro N° 2. Principales grupos de compuestos formados en los aceites y grasa durante el proceso de fritura..... | 35 |
| Cuadro N° 3. Índice de yodo de algunos aceites y grasas comestibles..... | 45 |
| Cuadro N° 4. Hidrocarburos policíclicos aromáticos presentes en alimentos..... | 47 |
| Cuadro N° 5: Clasificación de la IARC para los HAPs..... | 50 |
| Cuadro N° 6. Contenido máximo de benzo(a)pireno permitido en alimentos..... | 69 |
| Cuadro N° 7. Test químicos rápidos de detección de calidad del aceite..... | 76 |
| Cuadro N° 8: Características organolépticas de los alimentos fritos en aceites con diferente composición de compuestos polares..... | 78 |
| Cuadro N° 9 Condiciones para la extracción liquido-líquido en diferentes pruebas..... | 102 |

INDICE DE ABREVIATURAS

AGT: Ácidos grasos trans.

ANOVA: Análisis de la varianza con un factor.

AOAC: Asociación de Químicos Analíticos Oficiales.

B(a)P: Benzopireno.

CE: Comunidad Europea.

DAD: Detector de arreglo de diodos.

DHA: Ácido docosahexanoico

EPA: Ácido eicosapentaenoico

FAO: Food and Agriculture Organization.

FOM: Food Oil Monitor

FOS: Food Oil Sensor

FSH: Hormona folículo estimulante

HAPs: Hidrocarburos policíclicos aromáticos.

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia

IARC: International Agency for Research on Cancer.

IBr: Bromuro de yodo.

IK: Yoduro de potasio.

KOH: Hidróxido de potasio.

LH: Hormona luteinizante.

MeCN: Acetonitrilo.

NaOH: Hidróxido de sodio.

OMS: Organización mundial de la salud.

SPSS: Statistical Package for Social Sciencies

TG: Triglicéridos.

TPM: Componentes Polares Totales.

RESUMEN

El 3,4 Benzopireno es uno de los más grandes e importantes carcinógenos ambientales. Su presencia en los alimentos, genera productos de baja calidad y constituye un riesgo para la salud de los consumidores; pueden producir efectos mutagénicos y carcinogénicos, desórdenes en el desarrollo corporal, entre otros.

Objetivo: Determinar el grado de alteración y cuantificar al 3,4 benzopireno por HPLC en aceites comestibles según el tiempo de uso en chicharronerías y pollerías del centro histórico del Cusco.

Materiales y Métodos: Estudio cuasiexperimental correlacional de corte transversal. Donde se tomaron muestras de aceites y/o grasas usadas para fritura de 14 chicharronerías y 6 pollerías ubicadas en el centro histórico de la ciudad del Cusco. Se realizó los siguientes controles: índice de acidez, índice de yodo; así mismo se empleó el "Oxifrit-test" un método rápido de análisis para determinar el grado de alteración de las muestras. El análisis se realizó de acuerdo a los métodos oficiales de la AOAC. Para la determinación del 3,4 Benzopireno se usó la técnica de adición por estándar en HPLC – DAD.

Resultados: En la determinación de 3,4 Benzopireno en muestras de manteca alteradas por recalentamiento en chicharronerías se halló al benzo(a)pireno en una concentración promedio de 12.06 ug/Kg mientras que en muestras de aceite alterado de pollerías dicha concentración promedio fue de 9.809 ug/Kg. En los parámetros fisicoquímicos; índice de acidez, el valor más alto obtenido fue la muestra 15 con 2.73 % y el menor fue la muestra 14 con 0.75 %, con una media de 1,836 %. En el índice de yodo, para muestras de manteca y aceite vegetal se obtiene un valor máximo de 58,49 a un mínimo de 30.79, con una media de 44.7933mg/g de grasa. La prueba del Oxifrit-test nos muestra los siguientes resultados: a menos de 1 día de uso en un 71,4% el grado de alteración está en

el rango de sin alteración, en cambio a más de 3 días de uso en un 85,7% el grado está totalmente alterado.

Conclusiones: Del estudio se concluye que todas las muestras de aceite y manteca analizadas presentaban cantidades que superan considerablemente el límite establecido por países europeos que es de 2 ug/Kg. Además se encontró que la concentración de benzopireno está relacionada con el tiempo de reutilización de los aceites y mantecas.

Palabras claves: 3,4–Benzopireno, carcinogénico, HPLC, aceites termooxidados, grasas termooxidadas.

SUMMARY

The 3,4-Benzopyrene is one of the largest and most important environmental carcinogens. Their presence in food, produces low quality products and constitutes a health risk for consumers; They can produce mutagenic and carcinogenic, development disorders in body effects, among others.

Objective: To determine the degree of alteration and quantified by HPLC 3,4-benzopyrene in edible oils according to the time of use in pork and chicken restaurants the historic center of Cusco.

Materials and Methods: A quasi-experimental correlational cross-sectional study. Where samples of oils and / or fats used for frying 14 chicharrón and 6 pollerías located in the historic center of the city of Cusco were taken. The following controls are performed: acid, iodine; likewise the "Oxifrit-test" a fast method of analysis was used to determine the degree of alteration of the samples. The analysis was performed according to the AOAC official methods. 3,4 for determining Benzopyrene addition technique used by standard HPLC - DAD.

Results: 3,4 In determining Benzopyrene in butter samples altered by overheating chicharrón was found to benzo (a) pyrene in an average concentration of 12.06 ug / kg while in samples such altered oil pollerías average concentration was 9,809 ug / Kg . In the physicochemical parameters ; acid , the highest value obtained was sample 15 with 2.73 % and the lowest was 0.75 % Sample 14 , with an average of 1.836 % . In the iodine , for samples of vegetable oil shortening and a maximum value of 58.49 is obtained at a minimum of 30.79 , with a mean 44.7933mg / g fat . Oxifrit test -test shows the following results: less than 1 day of use by 71.4 % the degree of alteration is in the range unchanged , in contrast to more than 3 days of use 85 , 7% level is completely altered.

Conclusions: The study concludes that all samples analyzed exhibited oil and grease quantities that significantly exceed the limit set by European countries is 2 ug / kg. It was also found that the concentration of benzopyrene is related to the time of use of oils and fats.

Keywords: 3,4-benzopyrene carcinogenic, HPLC, thermooxidized oil, thermooxidized fat.

INTRODUCCION

El proceso de fritura, en el cual la grasa es calentada a temperaturas superiores a los 180°C, es utilizado como un medio de procesamiento de alimentos altamente atractivos para los consumidores. En la ciudad del Cusco existen varios establecimientos donde se realizan frituras como chicharronerías, pollerías, cuyerías, salchipaperías, entre otros; donde no se efectúa un control sanitario sobre la calidad de alimentos empleados en especial los aceites comestibles termo oxidados, que por su continua reutilización generan sustancias tóxicas de alto potencial carcinogénico.

Sabemos que el cáncer puede ser ocasionado por agentes físicos, químicos y biológicos; algunos de ellos han acompañado al ser humano desde que apareció en el planeta, como la luz ultravioleta del sol o las radiaciones ionizantes naturales. Otros han sido generados por nuestras propias actividades domésticas, tal y como sucede con los hidrocarburos policíclicos aromáticos (3,4 benzopireno) liberados en la combustión por sobrecalentamiento del aceite.

La evaluación de estos cambios químicos ha sido ampliamente estudiada a través de la medición de diferentes parámetros, específicamente para el control de la degradación alcanzada por las materias grasas sometidas a un proceso de fritura se utilizan a menudo los llamados índices analíticos rápidos, entre los cuales destacan los métodos colorimétricos basados en indicadores redox, como son el Oxifrit Test® que pueden ser de gran interés para conocer la evolución de la grasa de fritura en aplicaciones concretas(1)(2).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, este estudio plantea como objetivo principal evaluar el deterioro térmico a través de un método analítico cualitativo rápido, así mismo identificar al 3,4 benzopireno, principal sustancia cancerígena.

CAPITULO I

GENERALIDADES

1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente, está muy difundida la cocción de alimentos por inmersión en baños de aceite comestible. La alta temperatura a la que se somete el aceite provoca su oxidación y polimerización térmicas. Las sustancias resultantes de estos procesos disminuyen el valor nutritivo del aceite (3) y pueden resultar tóxicas (4).

Sin embargo, dados los efectos dañinos que las grasas y aceites de fritura degradados pueden causar si son consumidos regularmente, han sido de preocupación para las autoridades sanitarias en las últimas décadas.

Algunos estudios han atribuido a los aceites oxidados o a su fracción polar, efectos biológicos negativos, ya que muchos de los subproductos del proceso de fritura pueden actuar como destructores de vitaminas, inhibidores de enzimas, productos de oxidación de lípidos, irritantes gastrointestinales y potencialmente pueden causar mutaciones (5).

El problema radica en que los aceites excesivamente reutilizados son mucho menos eficientes y resultan en tiempos de cocción más prolongados y en una mayor absorción de grasa (6). Se ha determinado que las papas, por ejemplo, absorben alrededor de 8.5% de aceite cuando se fríen en aceite fresco, e incrementa a un 15% cuando se fríen en aceite excesivamente reutilizado, debido al aumento en la viscosidad. (5).

El benzopireno es la sustancia encontrada en el aceite térmicamente degradado. A pesar de que se sabe que esta sustancia es cancerígena, lo que se desconoce es en qué cantidad. Por ello la Organización Mundial de la Salud (7), ha recomendado que se evite el contacto con alimentos que puedan contener esta sustancia. El Ministerio de Sanidad ha confirmado que la legislación española no fija un tope a la cantidad que puede consumirse de esta sustancia.

Según las normas peruanas, aún no se establecen niveles máximos permitidos de benzopireno en alimentos, sin embargo según el plan de manejo ambiental del estado peruano, se determinan valores máximos de benzopireno en agua de 0.7µg/L; -así mismo en la contaminación del aire por la emanación de gases tóxicos producido por vehículos motorizados en Lima se establece para esta sustancia un nivel de 0.0001µg/m³ para las poblaciones y en zonas de trabajo 0.15µg/m³.

Estudios en Perú, como lo indica Gustavo Sarria, subdirector institucional del INEN, alertó a la población para que nunca reutilice el aceite que haya sido empleado en algún tipo de cocción, porque este producto, al calor, se descompone en esos elementos. Indicó que los nitritos y bencenos se pueden apreciar a simple vista como unas pequeñas partículas negras que se forman en el aceite usado y que pese a su inofensiva apariencia, son muy peligrosas (8).

El cáncer al estómago es uno de los de mayor incidencia, sobre todo en nuestro país. Tal como refiere el Doctor Hernán Espejo, experto gastroenterólogo, en el Perú las estadísticas de cáncer gástrico son 10 veces mayores que en EE.UU. Las cifras que se manejan en nuestro medio indican que, en los hombre, el cáncer al estómago es el más frecuente (20.5%) del total de casos de cáncer, mientras que en las mujeres es el tercero más frecuente (14.1%). La nutricionista del Hospital de la Solidaridad de Magdalena, Slovenia Ulloa indicó que el uso del aceite recalentado en las frituras también puede ser causal de enfermedades como Alzheimer o Parkinson (9).

Actualmente en el centro del Cusco existen diversos establecimientos donde el consumo de pollo a la brasa y chicharrones tienen alta demanda. En dichos establecimientos no se efectúa un control sanitario sobre la calidad de los alimentos empleados en especial de los aceites recalentados, que por su continua utilización genera sustancias tóxicas, de alto potencial carcinogénico como el 3,4 benzopireno. Teniendo en cuenta el riesgo de salud que dicha sustancia genera y

la falta de literatura científica en nuestro medio, se considera relevante el estudio de la determinación y cuantificación de 3,4 benzopireno por HPLC en chicharronerías y pollerías del centro histórico del Cusco, de esta manera brindar información a la población cusqueña, así mismo proporcionar mayores datos y pruebas que permitan gestionar un reglamento peruano en cuánto a los límites máximos de consumo de esta sustancia.

1.2. FORMULACION DEL PROBLEMA:

- ¿Dependerá del tiempo de reutilización de los aceites y mantecas comestibles usados en la fritura en chicharronerías y pollerías del centro histórico del Cusco, la presencia, cantidad de 3,4 benzopireno y el grado de alteración?

1.3. OBJETIVO GENERAL:

- Determinar el grado de alteración y cuantificar al 3,4 benzopireno por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en aceites y mantecas comestibles según el tiempo de uso en chicharronerías y pollerías del centro histórico del Cusco.

1.4. OBJETIVOS ESPECIFICOS:

1. Determinar y comparar si la concentración de 3,4 Benzopireno en las muestras depende del tiempo de uso de las mantecas o aceites.
2. Verificar el grado de alteración de las muestras mediante la valoración de la prueba oxifrit-test considerando el tiempo de uso de los aceites y de las mantecas.
3. Determinar si los parámetros fisicoquímicos (Índice de yodo e Índice de Acidez) se encuentran dentro de los límites establecidos por el Codex Alimentario y cómo influyen en el grado de alteración de las muestras.

4. Realizar un análisis organoléptico en los aceites de fritura térmicamente degradados, basado en el reglamento (CE) N°640/2008 de la comisión Europea y cómo influye en el grado de alteración de las muestras.
5. Optimizar la metodología de extracción de 3,4 benzopireno en aceites y mantecas mediante la técnica de adición de estándar para la identificación por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).
6. Evaluar si las concentraciones de 3,4 benzopireno en los aceites y grasas comestibles reutilizados se encuentran dentro de los límites aprobados por la Unión Europea.

1.5. LIMITACIONES:

- La adquisición de algunos reactivos alargó el tiempo de ejecución del proyecto, puesto que se utilizaron reactivos de grado químico analítico, algunos importados y otros fiscalizados, que necesitaban el permiso correspondiente de la Universidad.
- Debido al costo del análisis por HPLC, se limitó a hacer el estudio en los establecimientos de zonas representativas del Centro Histórico del Cusco.
- El equipo de HPLC de la Universidad no cuenta con detector de Fluorescencia por lo que se decidió optar por la técnica de Adición de estándar usando el detector DAD.

1.6. JUSTIFICACION:

Conocimiento:

Teniendo en cuenta que el consumo de aceites es habitual e indispensable, es bueno conocer que no solo la procedencia y características del aceite pueden afectar la salud, sino también la forma y número de veces que se emplea para cocinar.

La reutilización de los aceites es un proceso muy común en nuestra población, son diferentes problemas los que causa el consumo de aceites reutilizados, es por esto que se debe enfatizar en la importancia de no reutilizar los aceites, independiente de su composición, ya que su consumo puede traer consecuencias negativas, importantes para la salud.

A partir de dichos estudios, la Unión Europea ha decidido estudiar la presencia de los benzopirenos en los alimentos y establecer una legislación al respecto. Sin embargo aún no existen suficientes estudios que permitan establecer una legislación en Perú; la DIRESA sólo registra los límites máximos permisibles de benzopireno (0.0007 mgL^{-1}), en agua para consumo humano, más no se registran datos en alimentos.

Así mismo está sustancia por ser altamente volátil se absorbe fácilmente por la piel y por inhalación, generando contaminación no sólo al que lo ingiere sino también a todas las personas que están en contacto al momento de la fritura. Por tal motivo es necesario establecer una norma vigente, como también proponer los métodos de protección para evitar el contacto directo con el beznopireno.

En vista de que los establecimientos de comida más visitados por la población en general son las pollerías y chicharronerías, se decide realizar este estudio, brindando así los primeros datos de referencia en nuestra Ciudad.

Aplicabilidad:

Esta investigación está enfocada al análisis de aceites utilizados en los establecimientos de venta de comida (chicharronerías y pollerías) y así mismo identificar la presencia del 3,4 benzopireno que estos liberan al ser reutilizados constantemente; este trabajo contribuirá con posteriores investigaciones, para poder estudiar a todos los HAPs que producen cáncer en el ser humano, así mismo informar a la DIGESA sobre las concentraciones halladas del 3,4 benzopireno en aceites reutilizados en dichos establecimientos, brindando de esta manera los primeros datos de 3,4 benzopireno en alimentos en la ciudad del Cusco. Con los resultados obtenidos la población cusqueña tendrá conocimiento

del tipo de aceite que consume, y de todos los efectos perjudiciales que puede ocasionar para su salud. Además que nos brindará una perspectiva sobre la calidad alimenticia que las personas habitualmente deben tener, con la finalidad de preservar la salud, evitar el desarrollo de enfermedades que originan la destrucción histológica del organismo, y que posteriormente pueden terminar en cáncer.

Prioridad:

El presente estudio de investigación se realizó con la finalidad de determinar al 3,4 benzopireno en aceites reutilizados en chicharronerías y pollerías del centro histórico del Cusco, con lo cual se puede beneficiar la población en general, ya que por los efectos perjudiciales de esta sustancia en la salud de las personas es muy importante su estudio. Mediante dicho estudio se podrá plantear a las autoridades que intervengan en la inspección de establecimientos que expenden alimentos a base de fritura, que mejoren las condiciones de uso, y que cumplan con todos los estándares de calidad; así mismo mediante un trabajo en conjunto con las municipalidades y la DIGESA se establezca una normativa en cuanto al contenido máximo de benzopireno permitido en alimentos.

Económico:

La factibilidad de este estudio contó con recursos financieros, humanos y materiales, que nos permitió tomar datos importantes que favorecerán la salud de nuestra población cusqueña. Utilizando el Oxifrit-Test se realizaron análisis que permitieron detectar aceites y mantecas en buen o mal estado de manera rápida y efectiva, y de esta manera prevenir el consumo de aceites reutilizados y más aún prevenir el desarrollo de enfermedades cancerígenas por consecuencia del consumo excesivo de estas.

1.7. HIPOTESIS:

- “Los aceites y mantecas comestibles que son reutilizados por más tiempo en la fritura en chicharronerías y pollerías del centro histórico del Cusco presentan mayor cantidad de 3,4 benzopireno y mayor grado de alteración.”

CAPITULO II

MARCO TEORICO CONCEPTUAL

2.1. ANTECEDENTES

2.1.1. ANTECEDENTES INTERNACIONALES:

Dobarganes M.C., Marquez- Ruiz G. "Control de calidad de las grasas de fritura. Validez de los métodos de ensayos rápidos en sustitución de la determinación de compuestos polares." Sevilla 1995

Se estudió la validez de métodos de ensayo rápido para sustituir la determinación de compuestos polares establecida en la Norma de Calidad de aceites y grasas calentados. Dos pruebas comercializadas (VERI-FRY y OXIFRIT) y dos pruebas rápidas de laboratorio (PEREVALOV y Solubilidad en Acetona-Metanol 90:10) fueron aplicadas a un elevado número de muestras. Comparando los resultados obtenidos, con el contenido en compuestos polares, el ensayo denominado OXIFRIT dio el menor número de errores aunque la aplicación de cualquiera de las dos pruebas comercializadas contribuiría a mejorar la calidad de las grasas de fritura.

Pupin A. Figueredo M. "Benzo(a)pyrene in Brazilian vegetable oils." Brasil 1996

El método de análisis incluye la extracción líquido-líquido, limpieza en columna silica-gel y la determinación por cromatografía líquida de alta resolución usando la detección de fluorescencia. El límite de detección fue de 0,5 ug / kg. Benzo (a) pireno se detectó en casi todas las muestras, a niveles de hasta 58,9 ug / kg. Los niveles medios de B (a) P en los aceites de maíz eran 10,8 ug / kg. Los datos indican que los niveles de B (a) P encontrados en los aceites de maíz de Brasil

son relativamente más altos que los publicados en la literatura para los aceites de maíz europeos.

Moret S., Lanfranco S. “Los hidrocarburos aromáticos policíclicos en aceites y grasas comestibles: ocurrencia y métodos analíticos” Italia – 2000

El estudio es una revisión de los métodos de análisis de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH) para la determinación en materias grasas. La preparación de muestras para el análisis de HAP, si se lleva a cabo con un procedimiento tradicional es insuficiente para determinaciones rápidas de contenido de HAP en grasas y aceites comestibles. El reciente desarrollo de las denominadas técnicas acopladas (LC-GC, LC-LC-GC), ha introducido nuevas posibilidades para el análisis de HAP. Técnicas combinadas reducen drásticamente el tiempo de análisis, el volumen de los disolventes consumidos y manipulación de las muestras, y también son adecuados para los análisis de rutina

Yagüe Aylón MA. “Estudio de utilización de aceites para fritura en establecimientos alimentarios de comidas preparadas.” España 2004

La realización de este estudio se llevó a cabo en los meses de duración de las campañas de control sanitario oficial en establecimientos de elaboración de comidas preparadas. Para conocer los diferentes tipos de aceites utilizados en establecimientos elaboradores de comida preparadas (restaurantes, hoteles, comedores escolares, residencias) durante el proceso de fritura y sus características: grado de acidez, ingredientes, etc.

Del estudio se concluye que en la mayoría de freidoras el aceite usado es el de girasol, con diferentes variaciones y que el grado de oxidación es relativamente aceptable.

Asimismo la mayor parte de alimentos fritos son congelados y, en prácticamente todos los casos el destino de los aceites es el reciclado mediante la recogida por parte de empresas especializadas.

Navas Sánchez J. “Optimización y control de la calidad y Estabilidad de aceites y productos de fritura”. Barcelona 2005.

Este trabajo nace de la necesidad de las empresas fabricantes de patatas fritas y productos de aperitivos de un buen control del proceso de fritura. Por tanto, con este objetivo se seleccionaron, optimizaron y aplicaron diferentes métodos analíticos simples y rápidos que pudieran realizarse por parte de cualquier tipo de industria, sin excesivos requisitos técnicos, humanos y materiales. En dicha selección de métodos analíticos se escogieron tanto métodos físicos, químicos y cromatográficos que evalúan diferentes características relacionadas con la alteración (ej. hidrólisis de TG, grado de oxidación primaria o secundaria, destrucción de AGPI). En un primer etapa, se estudió el control del proceso de fritura en continuo mediante dos experimentos (el primero mediante el control de la alteración a lo largo de una semana en varias empresas y un segundo donde se evaluó el control de la alteración a lo largo de 5 semanas consecutivas en varias empresas) poniendo de manifiesto la utilidad de algunos de estos métodos para el seguimiento adecuado de los cambios que se producen durante la fritura (ej. el índice de p-anisidina, el porcentaje de polímeros de TG y la constante dieléctrica), los cuales podrían complementar y/o sustituir al grado de acidez (parámetro habitualmente utilizado por las empresas fabricantes de productos fritos como método analítico de control).

Dobarganes M.C., Marquez- Ruiz G. “Calidad de las grasas de fritura en el sector de restauración de Andalucía” Sevilla 2007

En este trabajo se resumen los resultados de la evaluación de 174 muestras obtenidas por los Servicios de Inspección en 143 establecimientos de preparación de alimentos de consumo inmediato.

La determinación de porcentaje de compuestos polares indicó que aproximadamente un 35 % de las muestras tuvieron niveles de alteración superiores a los establecidos en la reglamentación española para desechar la grasa (25 % de compuestos polares). Los niveles elevados de compuestos de polimerización y oxidación encontrados en un número significativo de muestras, demuestran la necesidad de mejorar la calidad de las grasas de fritura en este sector.

Na Li, Xiu-Ying Li, Zhe-Xiang Zou, Li- Rong Lin and Yao-Qun Li; “A novel baseline-correction method for standard addition based derivative spectra and its application to quantitative analysis of benzo(a)pyrene in vegetable oil samples” China 2011

En el presente trabajo, se propone un método novedoso que es aplicable particularmente cuando los componentes de la matriz de interferencia mostraron una amplia banda espectral, que era común en el análisis práctico. La línea de base derivado se estableció mediante la conexión de dos puntos de cruce de las curvas espectrales obtenidos con un método de adición de estándar (SAM). La aplicabilidad y la fiabilidad del método propuesto se demostró a través tanto de simulación teórica y aplicación práctica. En primer lugar, se utilizaron bandas gaussianas para simular interferentes y en el analito bandas para investigar el efecto de diferentes parámetros de interferir banda en la línea de base derivado. Este análisis de simulación verifica que la exactitud del método propuesto fue notablemente mejor que otros métodos convencionales, tales como pico a cero, tangente, y la medición de pico a pico. A continuación, el método de corrección de

línea de base propuesto anteriormente se aplicó a la determinación de benzopireno en las muestras de aceite vegetal por espectroscopia de fluorescencia sincrónica de segunda derivada. Los resultados satisfactorios se obtuvieron mediante el uso de este nuevo método para analizar un material de referencia certificado (aceite de coco) con un error relativo de 3,2% a partir de la concentración de B(a)P certificado. Potencialmente, el método propuesto se puede aplicar a varios tipos de espectros derivado en diferentes campos como la espectroscopía de absorción UV-visible, espectroscopia de fluorescencia y espectroscopia infrarroja.

Oliver Jimenez MP, Garcia Navarro J, Hernandez Hernandez E; “Estudio de compuestos polares presentes en los aceites de fritura de comedores escolares del departamento de Orihuela” España 2012

Estudio descriptivo y prospectivo realizado en el periodo de enero hasta junio de 2012 se realizó un estudio en todos los comedores escolares de los municipios de Orihuela para conocer el porcentaje de los compuestos polares de los aceites de fritura presentes en los comedores escolares y de los aceites sin utilizar presentes en los mismos. La muestra de estudio estuvo compuesta por 26 aceites de fritura usados. Para la recogida de datos se utilizó un cuestionario y cinco inspectores realizaron las mediciones utilizando dos instrumentos: Testo 265 que proporciona información sobre los TPM presentes en el aceite en dos rangos de temperatura. Ante un resultado no conforme se realizó una toma de muestra de control oficial para realizar la determinación de compuestos polares mediante cromatografía en columna.

Se concluye que dado que el aceite utilizado es mayoritariamente aceite refinado de girasol, la presencia de porcentaje de TPM (Componentes Polares Totales) en aceites sin usar condiciona la vida media de utilización del mismo.

Tama Viteri F., Sánchez V., Montaña M.; “Valor nutritivo y efectos metabólicos de la reutilización de aceites comestibles calentados y oxidados” Ecuador 2013

El grupo de investigación ha estudiado cromatográficamente los cambios suscitados en un tipo de triglicérido (aceite común) utilizado para el freído comercial a 360°F, durante 16 horas al día y por un tiempo de 10 días, observando grandes cambios. Los fenómenos ocurridos en las grasas ponen en evidencia cambios en el índice de saturación, sin cambios significativos en los insaturados con relación al aceite virgen, sin embargo, cabe suponer que corresponden a isómeros trans. Los valores altos del aducto de urea que se encontraron representan el reflejo de cambios significativos en la naturaleza organoléptica de los triglicéridos; aumentan con la intensidad del tratamiento térmico-oxidativo y con el grado de poliinsaturación de sus ácidos grasos.

Al tenor de los resultados obtenidos en la investigación utilizando aceite de palma parcialmente hidrogenado, como fuente original, se concluye que los cambios (excluyendo los radicales libres de oxígeno) encontrados no dejan de ser preocupantes (si se considera igualmente a los aductos de urea), en relación al tiempo de freído (variando de establecimientos censados entre 5-8 y hasta 10 días), tiempo que podría ser incluso subestimado en relación al uso del aceite y su reutilización, utilizado por la mayoría de locales comerciales para el preparado de comidas rápidas (fast food) y que asiduamente visitan y consume gran parte de la población.

Zamorano M., Martínez S. “Comportamiento del perfil de ácidos grasos de aceites y materias grasas hidrogenadas sometidos a calentamiento prolongado” Santiago de Chile 2013

Este trabajo tiene como objetivo determinar los cambios en el perfil en ácidos grasos, con énfasis en ácidos grasos trans (AGT), de diferentes tipos de materias grasas hidrogenadas y aceites vegetales sometidos a calentamiento. Para esto se

evaluó y se sometió a un ciclo de calentamiento por 50 h 7 diferentes tipos de materias grasas y como control se consideró a aceite de girasol, se evaluaron los tiempos 0, 10, 20, 30, 40 y 50 h. La composición en ácidos grasos se realizó por cromatografía gas - líquido previa preparación de los ésteres metílicos según Norma española, UNE-EN ISO 5509. Los resultados mostraron que la composición en ácidos grasos de todas las materias grasas estudiadas presentaron modificación durante el tratamiento térmico, observándose una disminución de los ácidos grasos poliinsaturados y un aumento o preservación de los ácidos grasos monoinsaturados y saturados. Los ácidos grasos trans mostraron contenidos importantes en mantecas hidrogenadas (20%), los que se mantuvieron constantes durante todo el calentamiento. El aceite de girasol y el de girasol alto oleico resultaron ser los más adecuados para freír, ya que no mostraron presencia de AGT y se mantuvieron aptos para ser utilizados hasta las 40 h de calentamiento.

2.1.2 ANTECEDENTES NACIONALES:

Huamán Gutiérrez, J.; De La Cruz Rodríguez, E. “Formación de hidrocarburos aromáticos policíclicos y del 3,4-Benzopireno en aceites comestibles alterados por recalentamiento.” Lima 2002

En el trabajo de Investigación se determinó la presencia de Hidrocarburos aromáticos policíclicos y del benzo(a)pireno en aceites comestibles termooxidados; para lo cual se tomaron muestras de aceites de los establecimientos donde se elaboraran una gran cantidad de frituras como son: las pollerías, churrerías, chicharronerías y chifas pertenecientes al distrito de Lima Metropolitana. Las muestras de aceites fueron tomadas en 41 puntos representativos del Cercado de Lima, elegidos por su gran afluencia comensal en forma diaria durante todo el día. El análisis de las muestras se realizó en el laboratorio de Toxicología y Química Legal de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la U.N.M.S.M. El estudio de estas sustancias de gran potencial

carcinogénico, se realizó en base a la técnica aceptada por la AOAC. El análisis del control de calidad toxicológico de los aceites recalentados, se realizó en base a las Normas Técnicas Peruanas, los Métodos Oficiales de Análisis de la AOAC, y Técnicas establecidas por la American Oil Chemist's Society; se realizaron los siguientes controles: Valor de carbonilo. Porcentaje de polímeros. Porcentaje de compuestos polares. Índice de yodo Índice de ácidos grasos libres. En la determinación de las sustancias cancerígenas en muestras de aceite no alterado por recalentamiento se halló al benzo(a)pireno en una concentración promedio de 22,36 ug/Kg mientras que en muestras de aceite alterado por recalentamiento dicha concentración promedio fue de 15,42 ug/Kg. Esta disminución en la concentración del benzo(a)pireno se puede deber a que durante el empleo de temperaturas elevadas durante el proceso de fritura, el benzo(a)pireno se desprende del aceite y forme parte del humo; el cual produce altos niveles de contaminación a nivel ambiental y representa un serio peligro para la salud pública.

2.2. BASES TEORICO CIENTIFICAS

2.2.1. DEFINICIÓN DE LÍPIDOS

Existen numerosas definiciones de lípidos, varias de ellas basados en su solubilidad. Por ejemplo, los lípidos son una amplia variedad de productos naturales incluyendo ácidos grasos y sus derivados, esteroides, terpenos, carotenoides y ácidos biliares, los cuales tienen en común una fácil solubilidad en solventes orgánicos tales como dietil éter, hexano, benceno, cloroformo, metanol". (10).

Otros autores han realizado definiciones de los lípidos en base a ésta propiedad, como la insolubilidad en agua y solubilidad en solventes no polares (11). Sin embargo, bajo este concepto quedan fuera algunos compuestos que han sido estimados como lípidos, ácidos grasos de cadena muy corta (C1-C4) los cuales son completamente miscibles en agua. Además, compuestos como ácidos

grasos de configuración conformacional trans (que no derivan de hidrogenación bacteriana) y el desarrollo de lípidos sintéticos sin calorías o reducidos en ellas complica el hecho, debido a que encajan en las definiciones basadas en la solubilidad pero no en el hecho de ser provenientes o derivados de organismos vivos(12).

A pesar de tal controversia en resumen, los lípidos han sido considerados como sustancias de origen biológico, compuestas de carbono, hidrógeno y oxígeno, constituyen un grupo químicamente diverso de compuestos cuya característica tiene la propiedad de ser: 1) insolubles en agua y 2) solubles en solventes no polares (orgánicos).

2.2.1.1. ESTRUCTURA MOLECULAR GENERAL DE LOS LÍPIDOS

Químicamente se constituyen por moléculas de carbono, hidrógeno y oxígeno que integran cadenas hidrocarbonadas alifáticas o aromáticas, asimismo contienen fósforo y nitrógeno (13).

Por otro lado, los lípidos a diferencia de otras biomoléculas no son polímeros como proteínas y carbohidratos, sino moléculas bastantes pequeñas que presentan una gran tendencia a asociarse mediante fuerzas no covalentes. La estructura general de los lípidos consta de una “cabeza” hidrófila polar, conectada a una “cola” hidrocarbonada hidrófoba apolar.

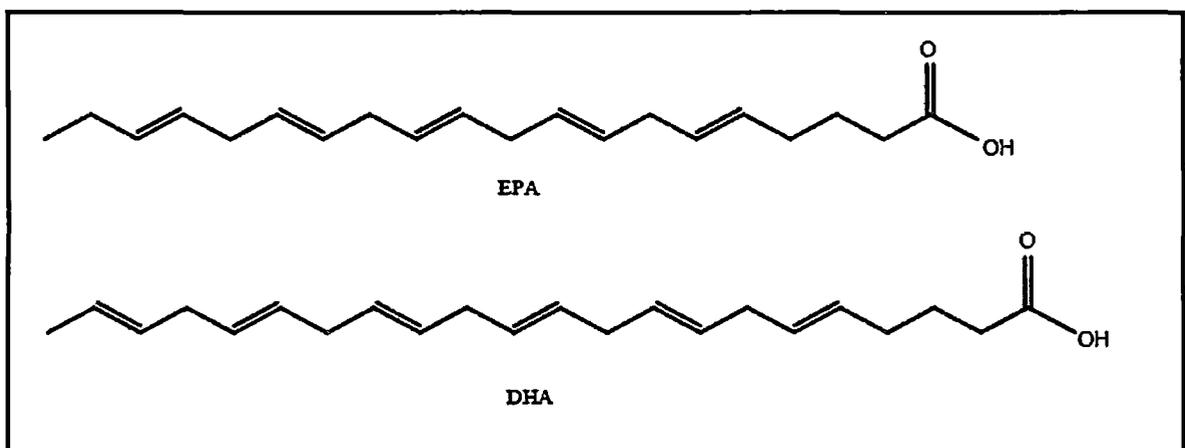
En disolución acuosa las moléculas lipídicas tienden a agruparse formando una asociación no covalente debido a que los grupos apolares se asocian mediante un efecto hidrófobo que estimula el incremento de la entropía. Asimismo, las interacciones de Van der Waals entre las zonas hidrocarbonadas de las moléculas permiten estabilización molecular.

Por otro lado, los grupos de cabeza hidrófilos polares de las moléculas lipídicas tienden a asociarse con el agua. Las moléculas lipídicas son anfipáticas y tienden

El ácido linoleico es también conocido como omega - 6, se encuentra presente en verduras, nueces, aceites vegetales como el de cártamo, maíz, soja y cacahuate. El metabolismo en el cuerpo es en forma de ácido araquidónico, que es precursor de muchos ecosanoides. El ácido alfa linolénico es conocido también como omega - 3.

Los no esenciales pueden ser sintetizados en el organismo. Se encuentra presente en vegetales de hoja, semilla de linaza y aceite de linaza, soja, nueces. Los dos tipos de Omega- 3 que se encuentran en el pescado, mariscos o aceites relacionados son el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexanoico (DHA), han demostrado ser beneficiosos para la salud (ver figura 2).

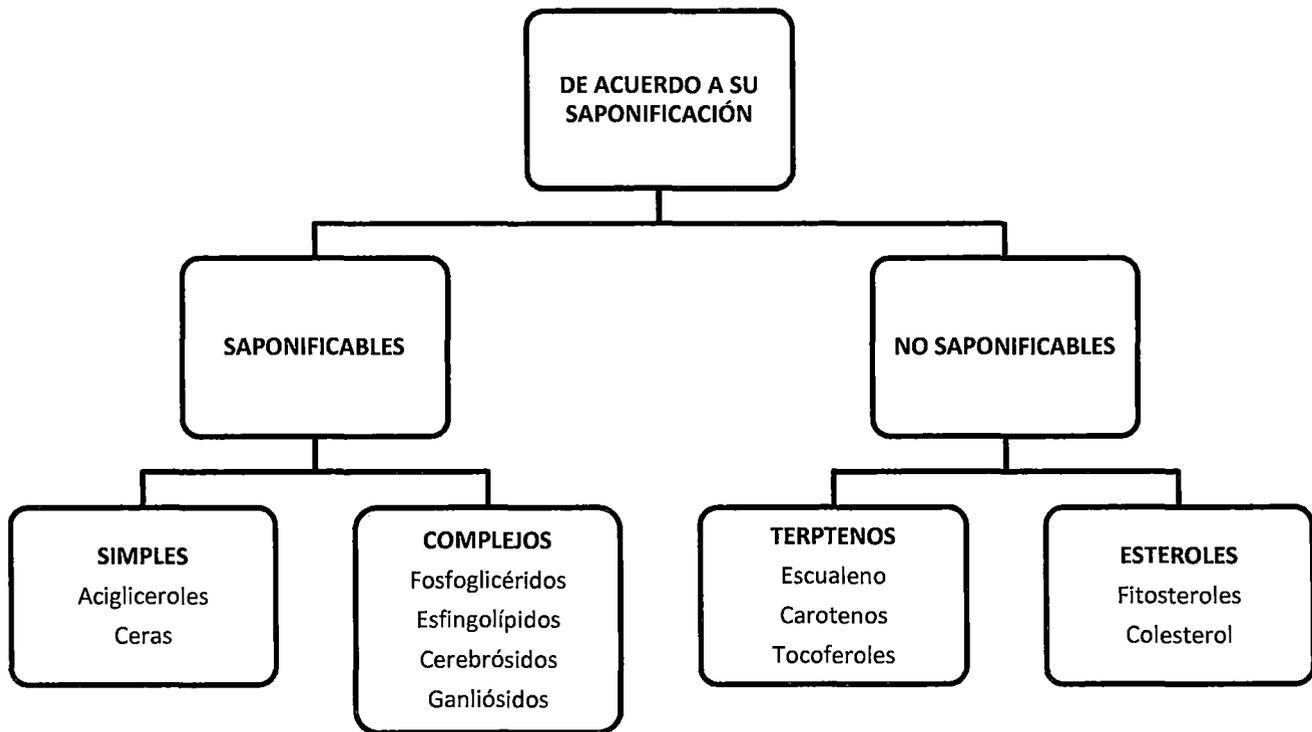
Figura 2. Estructura del ácido eicosapentaenoico(EPA) y del ácido docosahexanoico(DHA).



Fuente: (Thompson, 2008).

Otra clasificación es de acuerdo a su reactividad para generar sales de ácidos grasos y saponificarse para formar jabones, y aquellos que no son saponificables, como se esquematiza la clasificación de los lípidos en el esquema 1.

Esquema 1 .Clasificación de Lípidos de acuerdo a su saponificación



Fuente: Elaboración propia.

La clasificación más aceptada es aquella que se encuentra basada en su estructura. Dividiéndolos en tres grandes grupos: Simples, complejos y derivados o asociados. En la Cuadro 1 se describe cada uno de éstos grupos.

Cuadro 1: Clasificación de los Lípidos de acuerdo a su estructura.

| | | | |
|------------|--|------------------------|---|
| SIMPLES | Son ésteres de ácidos grasos y alcoholes. | Grasas y aceites | Ésteres de glicerol con ácidos monocarboxílicos. |
| | | Ceras | Ésteres de alcoholes monohidroxilados y ácidos grasos. |
| COMPUESTOS | Lípidos simples conjugadas con moléculas no lipídicas. | Fosfoglicéridos | Ésteres que contienen ácidos fosfórico en lugar de un ácido graso, combinado con una base de nitrógeno. |
| | | Glucolípidos | Compuestos de hidratos de carbono, ácidos grasos y esfingosinol, llamados también cerebrósidos. |
| | | Lipoproteínas | Integradas por lípidos y proteínas |
| DERIVADOS | Lípidos asociados. | Ácidos grasos | Derivados de lípidos simples |
| | | Pigmentos | |
| | | Vitaminas liposolubles | |
| | | Esteroles | |
| | | Hidrocarburos | |

Fuente:(Badui, 2006)

A continuación se describe la estructura y propiedades de algunos de los tipos principales de lípidos de interés para el presente trabajo.

a. Ácidos grasos:

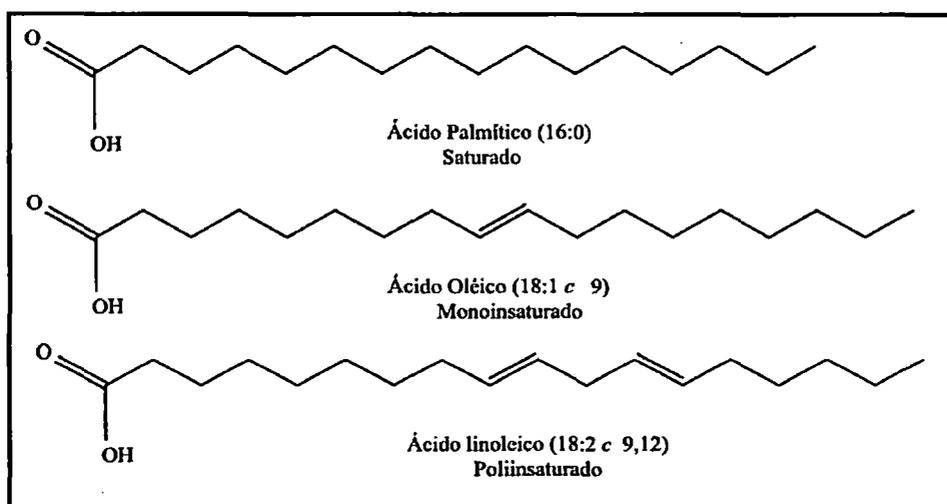
Los ácidos grasos son el tipo de lípidos más abundantes, forman parte de muchos lípidos complejos y representan un gran porcentaje de la composición de los tri, di y monoglicéridos, en forma de ésteres de ácidos grasos con glicerol.

Son ácidos monocarboxílicos, presentando el grupo -COOH en un extremo de la cadena cuya naturaleza puede ser diversa, es decir, polar: saturada, insaturada (monoeno, polienos conjugados o no), lineal, ramificada, cíclica, no polar: hidroxiácidos, cetoácidos u otros ácidos¹⁴. Aunque la mayoría de ellos se presentan en cadenas lineales con un número par de átomos de 4-304.

Los ácidos grasos se clasifican en: saturados, monoinsaturados y poliinsaturados de acuerdo a su número de dobles enlaces (ver figura 3). Los ácidos grasos saturados, generalmente se encuentran en estado sólido a temperatura ambiente. Los monoinsaturados son líquidos a temperatura ambiente. Mientras que los poliinsaturados suelen ser líquidos a temperatura ambiente, por lo cual los aceites presentan una gran concentración de ellos.

Las grasas animales proporcionan aproximadamente el 40 y 60% de su contenido energético de ácidos grasos saturados, por el contrario de los aceites vegetales proceden entre un 80 y 90% de ácidos grasos mono y poliinsaturados (16).

Figura 3: Estructura de los ácidos grasos saturados e insaturados.



Fuente: (Thompson, 2008).

Los ácidos grasos se pueden catalogar según el tamaño de su cadena; se consideran de cadena corta a aquellos que contienen menos de seis átomos de carbono. Los de cadena media poseen entre 6 y 12 átomos de carbono. Los de más de 12 carbonos son considerados de cadena larga (15).

b. Acilgliceroles:

Son lípidos neutros o sin carga, saponificables, derivados de la reacción de esterificación entre el glicerol (propanotriol) y una, dos o tres moléculas de ácidos grasos. Los más importantes son los triacilglicéridos debido a su abundancia.

Son ácidos grasos unidos a una molécula de glicerol, alcohol de tres carbonos que puede estar unido a uno, dos o tres ácidos grasos distintos, dando lugar a los mono, di y triglicéridos respectivamente.

Los ácidos grasos que se encuentran unidos a los acilgliceroles son ácidos carboxílicos lineales y largos entre 12 y 20 átomos de carbono. El punto de fusión de los acilgliceroles está determinado por el número de átomos de carbono y

grado de insaturación, la base de ello es el peso molecular, es decir a mayor peso molecular mayor será el punto de fusión (18).

c.Triglicéridos (TG):

La mayor parte de la ingesta diaria de las grasas del ser humano se encuentra como triglicéridos (95%), almacenándose en el organismo en dicha forma (19).

Los triacilglicéridos difieren en la identidad y en la posición de los ácidos grasos que esterifican la glicerina, pueden ser simples o mixtos. Los simples son aquellos cuyos tres ácidos grasos son iguales, se nombran por el ácido graso que contienen (por ejemplo trioleína, triestearina) sin embargo esta condición se presenta muy raramente.

d.Fosfolípidos:

Los fosfolípidos son componentes de la membrana que están presentes en los alimentos y grasas y aceites obtenidos por extracción. Los fosfolípidos incluyen a los fosfoglicéridos, esfingomielinas y cerebrósidos. Aunque constituyen solo una pequeña fracción de la grasa total de la dieta, constituyen una fuente importante de ácidos grasos esenciales (7).

e.Esteroles:

Son sustancias integradas por el grupo perhidrociclopentanofenantreno (esqueleto de átomos de carbono que forma tres anillos de ciclohexano y uno de ciclopentano, y un doble enlace en el carbono 5 y 6), una cadena hidrocarbonada alifática unida al carbono 17 y un grupo hidroxilo unido en el carbono 3. Son una clase de esteroides que se encuentran de forma abundante, entre los más importantes en los alimentos, nutrición y fisiología se pueden mencionar a la vitamina D, colesterol, hormonas esteroides y los ácidos biliares (18). Dentro del

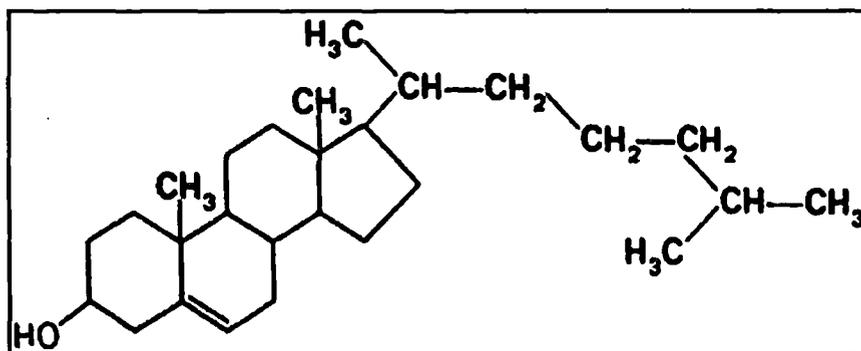
reino vegetal reciben el nombre genérico de fitosteroles mientras que en el animal es el colesterol (13).

f.Colesterol:

Es un esteroide (ver figura 4) de origen animal y el más importante, sólido a temperatura ambiente (17). Al igual que muchos esteroides el colesterol también se presenta como esterificado con ácidos grasos, denominándose éster de colesterol. Tales compuestos son la forma más común de colesterol en la dieta (18).

Su importancia biológica radica en ser componente estructural de la membrana celular, es precursor de los ácidos biliares, hormonas esteroideas y vitamina D, entre otros compuestos. En la actualidad, debido a su vinculación con las enfermedades cardiovasculares, se ha prestado mucha atención a los aspectos dietéticos, tales como el contenido del colesterol de los alimentos o en el efecto de la ingestión de ciertos alimentos en el nivel de colesterol sanguíneo (16).

Figura 4: Estructura química del colesterol.



Fuente: (Thompson, 2008).

2.2.1.3 TIPOS DE ACEITES Y GRASAS

A) Aceites vegetales comestibles:

La Reglamentación Técnico-Sanitaria española de aceites vegetales comestibles los agrupa en dos grandes grupos:

a) Aceites de oliva: Procedente únicamente de los frutos de olivo *Olea europea* L. y excluye aceites obtenidos por disolventes, procedimientos de reesterificación y toda mezcla con otros aceites y en ningún caso se aplicará al aceite de orujo de aceituna refinado (19).

- Aceite de oliva virgen: Aceites obtenidos de la fruta del olivo tan solo por métodos mecánicos u otros métodos físicos que no supongan la alteración del aceite, frutos que no sufren ningún tratamiento aparte del lavado, decantado, centrifugado o filtrado, y con la exclusión de aceites obtenidos utilizando diluyentes o adyuvantes que producen una acción bioquímica, o por reesterificación, o cualquier mezcla con otros tipos de aceites.
- Aceite de oliva refinado: Aceite de oliva obtenido mediante el refinado de aceite de oliva virgen, con una acidez máxima, en términos de ácido oleico, de 0,3g por 100g, y cumpliendo todas las características expuestas para esta categoría.
- Aceite de oliva: Compuestos de Aceites de oliva virgen y aceites de oliva refinado.

b) Aceite de orujo crudo: Aceite obtenido de orujo de oliva mediante tratamiento con diluyentes o métodos físicos o aceite correspondiente a aceite lampante, excepto por algunas características específica, excluyendo los aceites obtenidos

por re-esterificación, y mezclas con otros tipos de aceite, y cumpliendo todas las características expuestas para esta categoría.

- **Aceite de oliva-orujo refinado:** Aceite obtenido por el refinado de oliva u orujo crudo, con una acidez máxima en términos de ácido oleico de 0,3g por 100g, y cumpliendo todas las características expuestas para esta categoría.
- **Aceite de oliva-orujo:** Aceite de oliva obtenido por mezcla de aceite de oliva-orujo refinado y aceite de oliva virgen no lampante, con una acidez máxima en términos de ácido oleico de 1 g por 100 g, y cumpliendo todas las características expuestas para esta categoría.

c) Aceites de semillas oleaginosas: Son los obtenidos de las semillas oleaginosas expresamente autorizadas y sometidos a refinación completa previa su utilización para consumo humano (19) Entre ellas tenemos:

- ✓ Soja (*Glycine soja*, SEZ, Soja insípida, *Dolichos soja* L.) refinado
- ✓ Colza o nabina (*Brassica napus* B. *campestris*)
- ✓ Girasol (*Helianthus annuus* L.) refinado
- ✓ Cacahuete (*Arachis hipogea* L.) puede ser virgen o refinado
- ✓ Maíz (de germen de semillas de *Zea mays*)
- ✓ Algodón (género *Gossypium*) refinado
- ✓ Sésamo (*Sesamum indicum*)
- ✓ Pepita de uva (*Vitis europea* L.)
- ✓ Cártamo (*Carthamus tinctorius*)

B) Grasas comestibles:

Productos de origen animal o vegetal, o sus mezclas, *que reúnan las características y especificaciones de la Reglamentación Técnica Sanitaria, y*

cuyos componentes principales son glicéridos de los ácidos grasos, pudiendo contener otras sustancias en proporciones menores(19) Se clasifican en:

a) Grasas de origen vegetal: Son las obtenidas por distintos procedimientos a partir de frutos o semillas sanos y limpios.

- Manteca de coco: procedente del fruto del cocotero (Coco nucifera L.) adecuadamente refinada (color blanco o marfil)
- Grasa de palmiste: obtenida de la semilla del fruto de la palmera (Elaeis guinensis L.) adecuadamente refinada (color amarillo claro) (palm kernel oil)
- Manteca de palma: obtenida de la pulpa del fruto de la palmera (Elaeis guinensis L.) adecuadamente refinada (color amarillo rojizo).
- Manteca de cacao: obtenida por presión de las semillas del cacao descascarillado o de otros productos semidesgrasados derivados de estas semillas (de pasta de cacao)

b) Grasas animales: Manteca de cerdo, grasa de cerdo fundida, primeros jugos (grasa de corazón, riñones,etc), sebos comestibles y otras grasas animales.

c) Grasas anhidras: Son aceites y/o grasas comestibles y sus mezclas, de aspecto homogéneo y humedad inferior al 0,5%.

d) Margarinas y minarinas: Alimentos extensibles en forma de emulsión líquida o plástica tipo agua – aceite a partir de grasas o aceites comestibles que no proceden fundamentalmente de la leche y preparados grasos, con un 50% de ingrediente fundamental graso y otros ingredientes, con o sin agua.

2.2.2. FRITURA:

La fritura es una de las técnicas más antiguas de preparación de alimentos. En la actualidad, los alimentos fritos gozan de una popularidad cada vez mayor en el mundo y son aceptados por personas de todas las edades. La preparación de

estos productos es fácil y rápida y su aspecto y sabor se corresponden con los deseados por el consumidor (20).

Esta situación ha conllevado a que la fritura se haya generalizado en los establecimientos de alimentos rápidos ("fast foods"), en la restauración, en la propia industria alimenticia, por ejemplo los llamados "snacks", también en los hogares, etc.

Precisamente, la fritura es el uso principal de los aceites y las grasas en la cocina. En esta forma de procesar los alimentos a altas temperaturas, el medio de transferencia de calor es el aceite, el que imparte sabor, apariencia y textura al producto.

Para freír pueden utilizarse aceites, grasas o los denominados shortenings (generalmente aceites vegetales hidrogenados, semisólidos, plásticos). Tradicionalmente los términos aceite y grasa están determinados por el punto de fusión del producto lipídico, aceite cuando el mismo es líquido a la temperatura ambiente y grasa cuando tiene determinado grado de solidez a dicha temperatura. De hecho, el criterio que define estos términos es bastante ambiguo (19).

2.2.2.1 PROCESO DE FRITURA.

La fritura es un proceso físico-químico complejo, en el cual el producto a freír (papas, carne, pescado, productos empanados, etc.) se introduce crudo o cocido en el aceite durante determinado tiempo a temperaturas entre 175-195°C, para favorecer una rápida coagulación de las proteínas de la superficie del producto y provocar una casi impermeabilización del mismo, la que controla la pérdida de agua desde su interior, convirtiéndose en vapor (22).

Esta situación facilita la cocción interna del producto, el cual queda más jugoso y permite la conservación de muchas de las características propias del alimento,

mejorando en la mayoría de los casos, su sabor, textura, aspecto y color. Así es posible obtener un producto más apetecible, lo cual sin lugar a dudas contribuye al éxito de consumo de los productos fritos (22).

El producto frito posee una estructura distintiva. Su parte externa es una superficie que contribuye al impacto visual inicial debido a su tostado, presentando un color entre dorado y pardo, resultante de las reacciones de las proteínas y los azúcares por acción del calor, el pardeamiento no enzimático (Reacción de Maillard) y de los azúcares al sufrir la caramelización, dando lugar a un producto con aspecto agradable. El grado de oscurecimiento del alimento frito depende más del tiempo y la temperatura de freído en combinación con la composición química del producto, que de la composición del aceite utilizado en la fritura. Los procesos que ocurren también producen los sabores deseados y dan lugar a una capa crujiente superficial como consecuencia de la deshidratación del alimento durante el freído.

El calor reduce el contenido de humedad de esta capa hasta 3% o menos y la humedad desprendida es la causante del vapor generado durante el proceso (23). El espacio libre que deja el agua que escapa es ocupado por el aceite. La cantidad de aceite absorbido por un alimento depende en gran medida de su contenido de humedad, porosidad y superficie expuesta al aceite de fritura. Esta cantidad es aproximadamente entre el 20 y 40% en base al peso del alimento frito. Freír alimentos a temperaturas demasiado bajas provoca que los mismos atrapen más cantidad de grasa en su interior (24).

El aceite absorbido le imparte al alimento olor, sabor y color y además favorece la palatabilidad. Por esto, si el aceite tiene sabor u olor extraño, el alimento frito lo tendrá. Por experiencias prácticas se conoce que no se deben freír alimentos en un aceite donde fue frito otro producto de sabor totalmente incompatible, por ejemplo, no se freirán papas con un aceite que previamente fue utilizado para freír pescado. (25)

Los cambios físicos y químicos que ocurren durante el proceso de fritura tanto en el alimento como en el aceite estarán determinados por:

- Tipo, características y calidad del aceite utilizar.
- Tipo y características del alimento a freír.
- Condiciones del proceso de fritura:
 - Temperatura
 - Tiempo
 - Presencia de metales
 - Presencia de oxígeno
 - Presencia de luz
 - Presencia de antioxidantes
 - Características de la freidora
 - Grado y velocidad de renovación del aceite en el transcurso del proceso (Descarte del aceite)

Dichos cambios generalmente conllevan al deterioro del aceite por la ocurrencia de procesos de hidrólisis, oxidación y polimerización. En el caso de los alimentos pueden ser cambios deseables, de hecho son los que se persiguen con la fritura, como la mejora en la calidad sensorial (la formación de compuestos aromáticos y colores atractivos, entre otros), la típica de los alimentos fritos, y también una mayor conservación, pero por otra parte, pueden ocurrir cambios indeseables que provocarán afectaciones de los atributos sensoriales y de la calidad sanitaria del producto (pueden aparecer compuestos sulfurados y derivados de la pirazina en el alimento a partir de interacciones entre este y el aceite, etc.) (29).

Las condiciones del proceso deben decidirse sobre la base de obtener un producto frito de calidad, un buen aprovechamiento del aceite y una rentabilidad adecuada de la línea de producción.

2.2.2.2 EL ACEITE EN LA FRITURA.

Dentro de la gran variedad de aplicaciones que tienen los aceites y las grasas comestibles, la fritura es la aplicación en la que se somete a estos productos a las condiciones más severas.

Para lograr un proceso de fritura adecuado es necesario sumergir el alimento en un medio líquido que pueda mantener una temperatura constante y alta sin que se pierdan las características nutricionales del mismo por efecto del calentamiento.

El agua, por ejemplo, no sirve para estos fines ya que cambia de fase líquida a fase vapor a 100°C, temperatura que es insuficiente para modificar la superficie de los alimentos de origen proteico o con alto contenido de hidratos de carbono. Las grasas y aceites, ya sea de origen animal o vegetal, si son adecuados para estos fines porque pueden ser sometidos a temperaturas mucho más altas sin inconvenientes de inestabilidad, dependiendo eso sí, de su composición en ácidos grasos.

Como ya se expresó anteriormente, la función del aceite durante el proceso es ser el medio transmisor del calor y a su vez aportar sabor y textura a los alimentos. El aceite se convierte en un ingrediente del alimento frito al ser absorbido por éste, por tanto la estabilidad del aceite y su grado de alteración influirán directamente en la calidad y la duración del producto frito. También es importante tener en cuenta el sabor característico de ciertas grasas, fundamentalmente de origen animal, las que pueden afectar la calidad del producto frito.

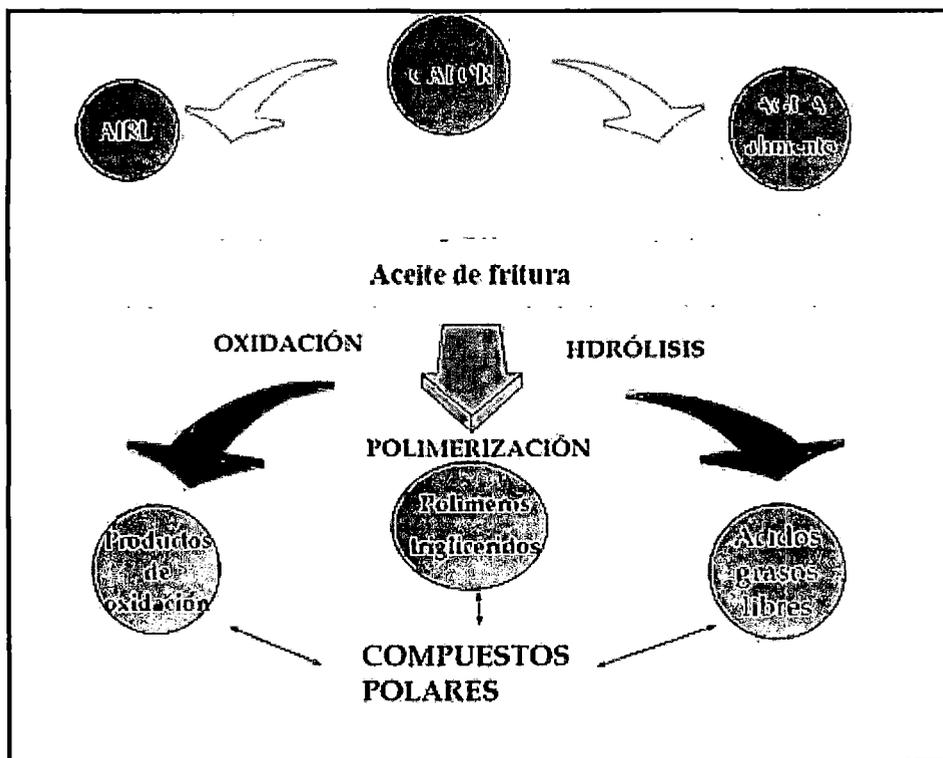
Por otra parte, la transferencia del calor al alimento por el aceite está dada por la presencia de surfactantes. Altos niveles de especies surfactantes en el aceite pueden producir un contacto excesivo entre el aceite y el alimento, lo que deriva en un producto cocido inapropiadamente, de color oscuro y excesivamente aceitoso.

2.2.3. ALTERACIONES DE LOS LÍPIDOS EN EL PROCESO DE CALENTAMIENTO DE LAS GRASAS Y ACEITES.

Durante el proceso de calentamiento de las grasas y aceites se ven favorecidas diversas reacciones químicas y enzimáticas de deterioro de lípidos, cuyos agentes causales son primordialmente el contenido de agua, oxígeno, así como la presencia de metales (27).

La figura 5 esquematiza las posibles alteraciones cuando un sistema lipídico es sometido a calentamiento. Estas reacciones químicas pueden observarse visiblemente en el baño de freído, ocasionando oscurecimiento, aumento de la viscosidad, formación de espuma, producen compuestos volátiles que imparten olores y sabores desagradables y por consecuencia se generan atributos sensorialmente desagradables, entre otros.

Figura 5. Posibles alteraciones producidas en un sistema lipídico sometido a calentamiento.



Fuente: (Lercker, 2010).

En el proceso de freído no solo ocurren modificaciones del estado físico y de las características organolépticas del aceite o grasa y/o del alimento frito, estudios recientes demuestran que existen problemas de tipo nutricional (18) y toxicológico producto de la degradación química de los componentes lipídicos y de los nuevos compuestos formados. Los compuestos tóxicos pueden tener numerosos efectos, tales como inhibición enzimática, irritación gastrointestinal, e incluso algunos compuestos han mostrado actividad cancerígena y mutagénica (27).

Los productos de oxidación más peligrosos desde el punto de vista de la actividad cancerígena son los derivados de la oxidación del colesterol (27).

En los aceites vegetales debido a la concentración de colesterol contenida es poco representativo, sin embargo en las grasas animales, como la manteca de cerdo, cuyo contenido de colesterol es de aproximadamente 70%, resulta importante su estudio.

En el cuadro 2 se clasifican las alteraciones, agentes causante, así como los compuestos nuevos formados durante el proceso de fritura.

Cuadro 2. Principales grupos de compuestos formados en los aceites y grasa durante el proceso de fritura.

| TIPO DE ALTERACION | AGENTE CAUSANTE | COMPUESTOS NUEVOS RESULTANTES |
|--------------------|-----------------|---|
| Hidrolítica | Humedad | Ácidos grasos libres Diacilgliceroles Monoacilgliceroles |
| Oxidativa | Aire | Monómeros oxidados Dímeros y polímeros oxidados. Compuestos volátiles(aldehídos,cetonas,hidrocarburos,etc). Óxidos de esteroles. |
| Térmica | Temperatura | Dímeros y polímeros no polares. Monómeros ciclícos. Isómeros trans y de posición. |

Fuente: (Lercker ,2010).

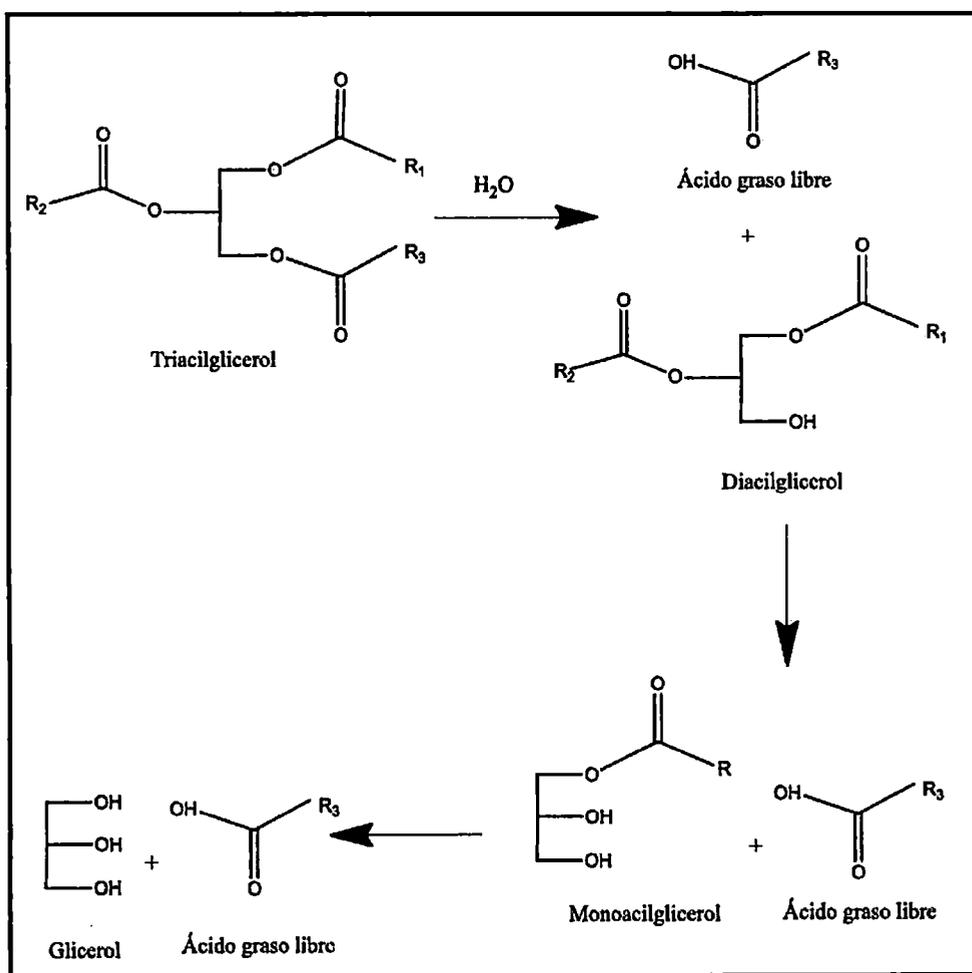
2.2.3.1. Reacciones hidrolíticas

Las reacciones de hidrólisis ocurren en presencia de agua (humedad) y se ven favorecidas por la temperatura, provocando la ruptura del enlace éster de los triglicéridos, los cuales se descomponen en monoglicéridos y diglicéridos

liberando ácidos grasos, dando como consecuencia el aumento de la acidez de la grasa o aceite(27).

La hidrólisis es una de las reacciones más importantes durante la fritura. En la figura 6 se representa la reacción de hidrólisis de los triglicéridos, esquematizando los compuestos formados: glicerol, ácidos grasos, monoglicéridos y diglicéridos (25). Un aceite recalentado o pirolizado da lugar a la formación de acroleína, sustancia muy irritante que puede hacer el ambiente de trabajo bastante incómodo. Se obtiene a partir de la glicerina resultante de la hidrólisis de los acilglicéridos (25)

FIGURA 6. Reacción de hidrólisis de los triglicéridos.



Fuente: (Lawson, 1999).

2.2.3.2. Reacciones de oxidación

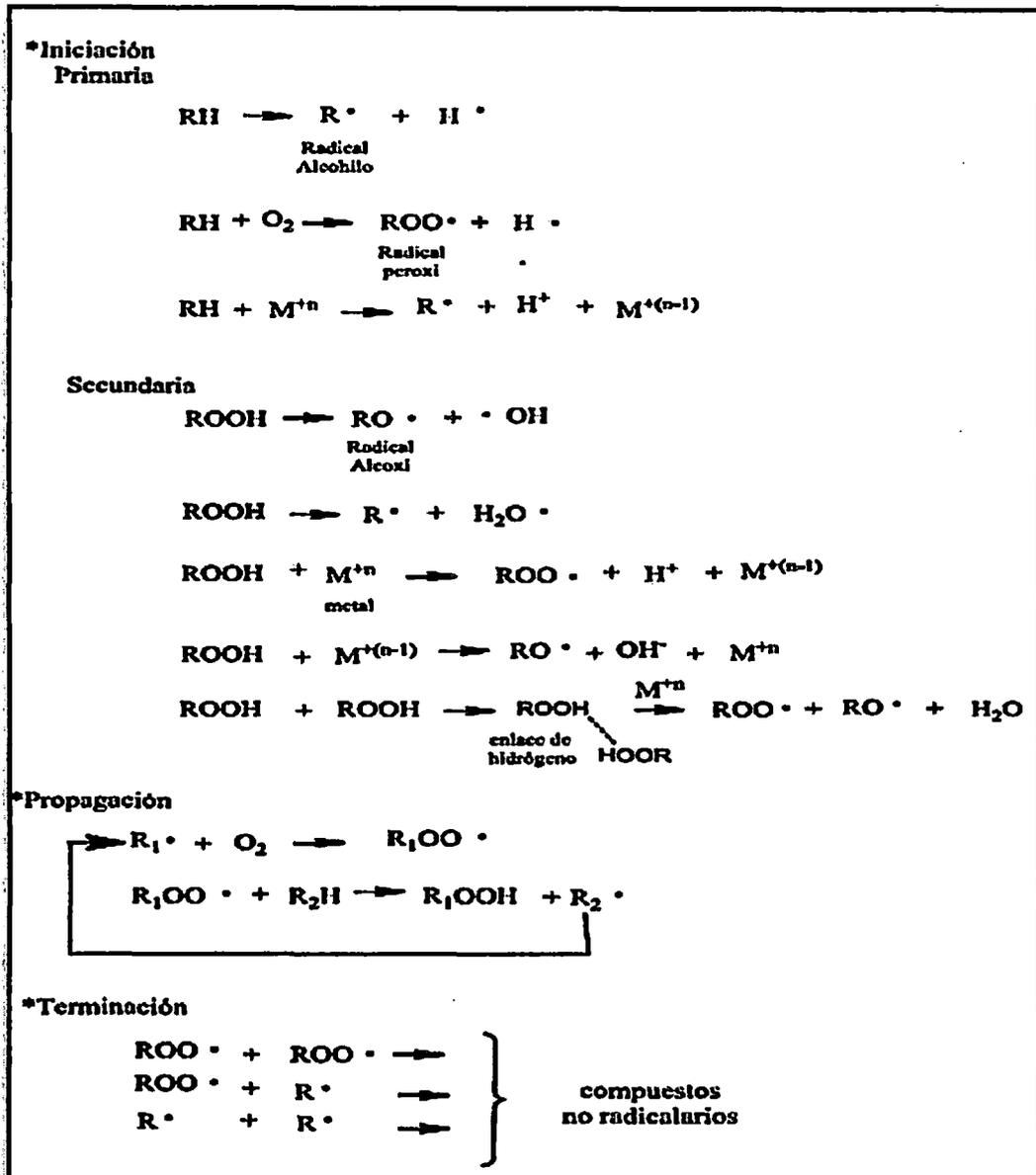
Las reacciones de oxidación ocurren en cadena, una vez iniciada continúa hasta la oxidación total. Los productos que se obtienen de la oxidación son desagradables organolépticamente así como desde el punto de vista nutricional (29).

La oxidación puede ser catalizada por varios agentes químicos (peróxidos, metales de transición), físico-químicos (calor, radiación a elevada energía, foto-oxidación), pero también puede ser a determinadas enzimas (oxidasas y peroxidasas). En todos los casos es necesaria la presencia de oxígeno (16).

En el mecanismo general de la oxidación de lípidos se distinguen tres fases (ver figura 7).

- a. **Reacciones de iniciación:** a partir de ácidos grasos insaturados, conducen a la formación de radicales libres o de peróxidos lipídicos. Por requerir una elevada energía de activación, estas reacciones son favorecidas por temperaturas elevadas, la luz y trazas de metales que actúan como catalizadores. En esta etapa se generan peróxidos que cuando ha aumentado el contenido de ellos, se origina la iniciación secundaria donde los peróxidos empiezan a descomponerse.
- b. **Reacciones de propagación:** Constituyen la etapa de oxidación de los lípidos insaturados por el oxígeno gaseoso. Se caracterizan por una acumulación de peróxidos lipídicos y requieren la intervención de radicales libres. La energía de activación de estas reacciones es muy baja.
- c. **Reacciones de terminación:** En esta fase los radicales libres se asocian para dar compuestos no radicalarios muy diversos, en general aldehídos o cetonas.

FIGURA 7. Mecanismos de las fases de las reacciones de oxidación.



Fuente: (Lawson, 1999).

En el proceso de fritura se dan todas las condiciones para que el aceite se oxide. Atendiendo a los factores que favorecen la oxidación existirán altas temperaturas, presencia de oxígeno del aire, elevadas cantidades de ácidos grasos insaturados (oleico, linoleico, linolénico, etc.), puede haber presencia de luz y posibilidad de existencia de metales aportados por el equipamiento utilizado (30).

2.2.3.3 Reacciones de polimerización

Los radicales libres formados en las reacciones anteriores tienden a combinarse entre ellos con otros ácidos grasos, y dan lugar a polímeros, formando compuestos lineales, de longitud un poco larga, ramificada o cíclica especialmente si existen dobles enlaces(13).

La reacción se acelera al freír a temperatura demasiado elevada por encima de 200°C, por la presencia de oxígeno, la utilización de un aceite para fritura de baja calidad y una mala práctica de fritura; por ejemplo, el calentamiento del aceite durante periodos largos de tiempo con pocos o ningún alimento friéndose (27).

Las reacciones de polimerización a elevada temperatura pueden seguir una vía directa a partir de los triglicéridos, sin intervención del oxígeno, pero sí a consecuencia del incremento de la descomposición biomolecular de los peróxidos lipídicos, por ejemplo mediante la reacción de radicales de alilo. Formando dímeros y trímeros clasificados en polares (oxidados) y no polares (no oxidados) esto es en función de la combinación de radicales oxidados o no (29).

Da lugar a la formación de monómeros y dímeros, muchos de ellos son tóxicos, además oscurecen el aceite. Los polímeros favorecen la formación de espuma y por tanto se incrementa el proceso oxidativo. Hay aumento de la viscosidad y un mayor arrastre de aceite por el producto frito. Aparece una capa de polímeros adherida a las paredes de la freidora e inclusive en la superficie del aceite que es difícil de eliminar. Existen polímeros de origen oxidativo y de origen térmico.

Se han expresado criterios con relación a que los polímeros de alta masa molar no son digeribles, por lo que tienen poca importancia en cuanto a la nutrición y la salud de los consumidores, además se ha observado que las grasas usuales en condiciones normales de fritura industrial solo producen una cantidad reducida de estos compuestos. Los monómeros y dímeros, polímeros de baja masa molar, si son absorbidos por la pared intestinal y muchas de estas sustancias están reconocidas como tóxicas o potencialmente cancerígenas, por ejemplo el benzopireno producido por la ciclación del colesterol (31).

2.2.4. CRITERIOS DE CALIDAD Y DETERIORO DE LAS GRASAS Y ACEITES

La calidad de un ingrediente o alimento está determinada por diferentes factores y dentro de éstos están su composición química y la biodisponibilidad de los componentes nutricionales de los alimentos consumidos. Además, es necesario que los alimentos estén libres de impurezas y sobretodo libres de contaminación microbiana y de sus productos metabólicos (toxinas). Se afirma que el aceite pasa por 5 fases a lo largo de su período de utilización en cuanto a calidad del producto frito se refiere, éstas son:

Fase 1^a (aceite inicial): en este punto el aceite es nuevo, no presenta productos de degradación ni contaminantes y, por lo tanto es poco viscoso y tiene poco poder surfactante. Estas dos características hacen que el contacto del producto con el aceite (mojabilidad) no sea total y por ello se disminuye la transmisión de calor y la absorción de aceite por parte del producto.

Fase 2^a (aceite fresco): debido al inicio de los procesos de hidrólisis se han ido formando monoglicéridos y diglicéridos que aumentan ligeramente el poder surfactante del aceite. Analíticamente empieza a aumentar la acidez debido a los ácidos grasos liberados.

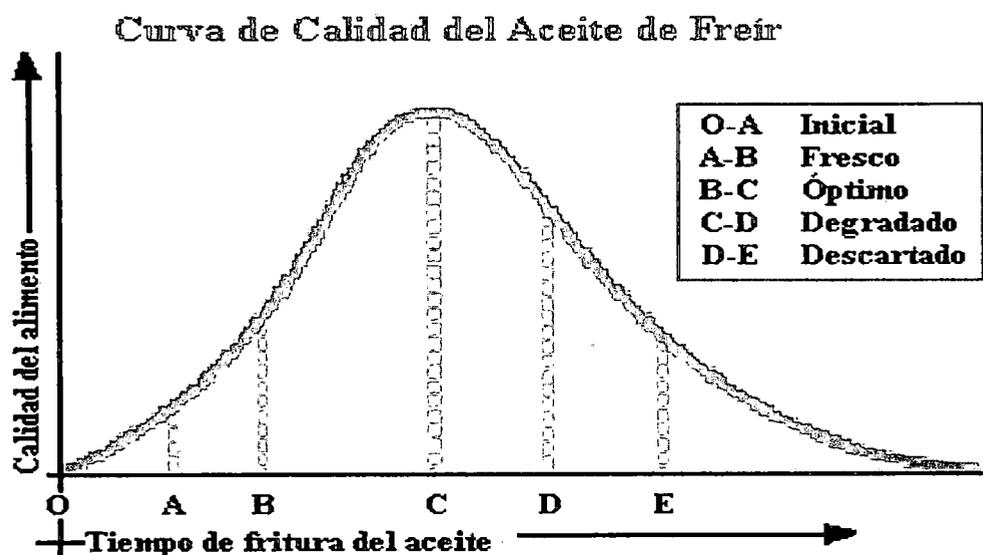
Fase 3^a (aceite óptimo): la cantidad de sustancias emulsionantes es la adecuada para un correcto contacto aceite/producto. La transmisión de calor será correcta y la absorción de aceite la apropiada. Como contrapartida se empieza a formar espuma que favorecerá la oxidación.

Fase 4^a (aceite degradado): aparecen sustancias contaminantes, los niveles de hidrólisis y oxidación son elevados. El producto absorbe un exceso de aceite y hay un exceso de cocción de la zona externa del producto.

Fase 5ª (aceite descartado): se agravan los problemas de la fase anterior. Aparecen sabores y olores anómalos, y se produce humo dando origen a atmósferas irritantes en la sala de fritura. Se va alcanzando el punto de ignición o inflamación ("flash point") del aceite, con el peligro que ello conlleva.

La relación directa que existe entre la calidad del aceite y la del alimento, se aprecia mejor en la figura 8, en la curva de calidad del aceite de freír, desarrollada por Libra Laboratorios de los E.U.A.(35)

Figura 8. Influencia en el aceite de freír en la calidad del producto.



Libra Laboratories, Inc. 1988

Fuente: National Cottonseed Products Association

Para la evaluación de muestras pueden realizarse los siguientes análisis:

1. Análisis organoléptico: es el análisis más real, ya que la aceptación de un producto depende de la percepción del consumidor. Se realiza con un panel de degustadores quienes siguen algunos criterios de evaluación. La principal desventaja es la subjetividad del análisis.

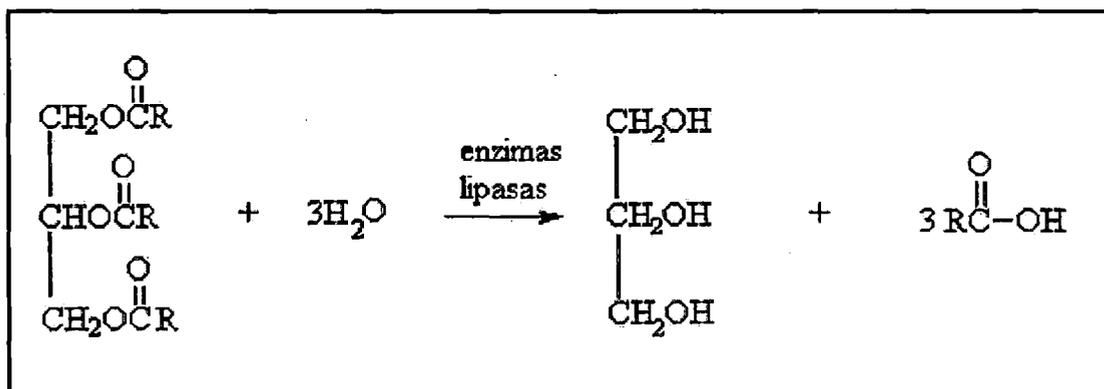
2. Análisis químicos: es de gran valor ya que pueden avisar de la posible inestabilidad o de un mal proceso. Pueden realizarse análisis de índice de yodo, índice de acidez, entre otros.

2.2.4.1. ÍNDICE DE ACIDEZ

La lipólisis es el proceso de degradación de las grasas, mediante diferentes mecanismos. Como por ejemplo, pueden ser catalizada por enzimas como las lipasas, y en ciertas condiciones durante el freído, la presencia de agua a elevada temperatura. La reacción hidroliza el enlace éster de los triacilglicéridos y de los fosfolípidos, liberando ácidos grasos, los cuales son más sensibles a la autoxidación que la molécula enlazada en su forma esterificada.

Siendo por lo tanto, los responsables del grado de acidez de las grasas, favorecer procesos oxidativos y como consecuencia de su acumulación puede dar lugar a sabores desagradables, es decir la acidez libre de los lípidos indica fundamentalmente la alteración de los triglicéridos por hidrólisis química o enzimática de los acilgliceroles y fosfolípidos, tal como se observa en la figura 9.

Figura 9. Reacción de hidrólisis de triglicéridos



Fuente: (Panreac, 1999).

El índice de acidez se define como los miligramos de NaOH o KOH necesarios para neutralizar los ácidos grasos libres presentes en 1 gramo de aceite o grasa, y constituye una medida del grado de hidrólisis de una grasa. El resultado puede expresarse de tres formas, según la naturaleza de la muestra: cantidad equivalente en ácido oléico, cantidad equivalente en ácido palmítico y cantidad equivalente en ácido láurico (32).

El comportamiento del Índice de Acidez (expresado como % de Ácido Oleico) durante el almacenamiento en los aceites y grasas comestibles evidencia un incremento en una primera etapa, como resultado de la actividad enzimática de las lipasas, hasta alcanzar un valor máximo, a partir del cual comienza a disminuir. Esta disminución pudiera ser explicada por el hecho de que los ácidos grasos libres hayan comenzado a oxidarse a compuestos oxigenados, como por ejemplo los hidroperóxidos, por la acción de agentes químicos (oxígeno, temperatura, luz, trazas metálicas) o agentes bioquímicos (microorganismos, enzimas lipoxidasas) o la combinación de ambos, en función de las condiciones de almacenamiento y de la composición del aceite almacenado.

Este comportamiento permite inferir que la determinación del Índice de Acidez no ofrece por sí sola información concluyente sobre el estado cualitativo de un aceite. Así, un valor bajo pudiera indicar: o bien que el producto está poco hidrolizado, o bien que el estado de deterioro es más avanzado y que parte de los ácidos grasos libres han comenzado a oxidarse (33).

La Norma Técnica Peruana NTP 209.226 y el Codex alimentarius recomienda que el aceite destinado al consumo humano de los productos fritos deben cumplir con los siguientes requisitos:

Acidez Máx 1 % (expresado como ácido oleico)

Fundamento del método

La determinación del índice de acidez es una reacción de neutralización donde los iones H^+ provenientes de los ácidos grasos libres reaccionan con los iones OH^- de la solución de hidróxido de potasio, dando lugar a la formación de agua y el correspondiente esterato (ver Figura 10). Determinando el punto de equivalencia mediante un indicador ácido-base (fenolftaleína el más recomendado)(34).

Figura 10. Reacción de neutralización de los ácidos grasos para la determinación del índice de acidez



Fuente: (Panreac, 1999).

Para la determinación del punto final es más recomendable utilizar 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. El potenciómetro permite obtener la curva de neutralización, así como el punto de equivalencia correspondiente a la cantidad de potasa necesaria para la neutralización (32)(34).

2.2.4.2. ÍNDICE DE YODO

El Índice de Yodo es el número de gramos de yodo absorbido por 100 g de aceite o grasa y es una de las medidas más útiles para conocer el grado de saturación de estos. Los dobles enlaces presentes en los ácidos grasos no saturados reaccionan con el yodo, o algunos compuestos de yodo, formando compuestos por adición. Por lo tanto, mientras más bajo es el Índice de Yodo, más alto es el grado de saturación de una grasa o aceite. El Índice de Yodo es una propiedad

química característica de los aceites y grasas y su determinación puede ser utilizada como una medida de identificación y calidad. El siguiente cuadro muestra los Índices de Yodo característicos de algunos aceites y grasas (35).

Cuadro 3. Índice de yodo de algunos aceites y grasas comestibles

| ACEITE Y GRASA | INDICE DE YODO |
|-----------------------|-----------------------|
| Aceite de algodón | 99-113 |
| Manteca de cerdo | 55-65 |
| Aceite de coco | 6-10 |
| Manteca de cacao | 33-42 |
| Aceite de girasol | 125-136 |
| Aceite de maíz | 103-130 |
| Mantequilla | 26-42 |

Fuente: Zumbado, H., 2002.

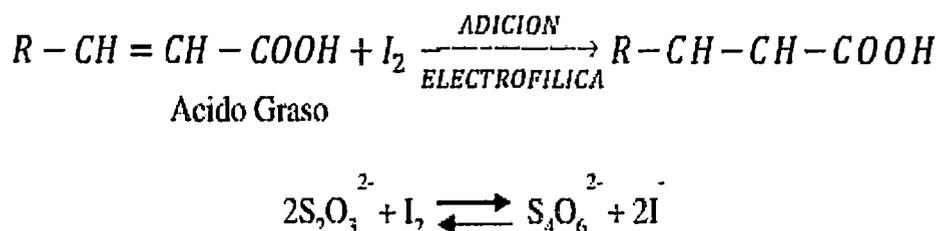
Durante el almacenamiento, en tanto un aceite sufre procesos de oxidación, el Índice de Yodo muestra una tendencia decreciente por cuanto estos procesos oxidativos tienen lugar precisamente sobre los dobles enlaces, saturando la molécula y provocando por consiguiente una disminución de este índice.

El índice de yodo será mayor cuanto mayor sea el número de dobles enlaces por unidad de grasa, utilizándose por ello para comprobar la pureza y la identidad de las grasas 1, 20. A la vez que los dobles enlaces de los ácidos grasos insaturados se determinan también las sustancias acompañantes insaturadas, por ejemplo, los esteroides (36).

Fundamento del método

En el ensayo se hace reaccionar una cantidad medida de grasa disuelta en un disolvente, con un exceso medido de yodo o algún otro halógeno, el cual reacciona con los enlaces dobles carbono-carbono. Después de añadir una disolución de KI para reducir el exceso de IBr a yodo libre, se determina volumétricamente el yodo liberado con una disolución de tiosulfato de sodio, previamente valorada frente a un patrón, utilizando almidón como indicador (ver figura 11).

Figura 11. Reacciones química de halogenación



Fuente: (Mora-Lizcano, 2007).

2.2.5. AGENTES TÓXICOS GENERADOS DURANTE EL PROCESO DE FRITURA

Un gran número de sustancias se sintetizan cuando los aceites se someten a temperaturas elevadas, como ocurre cuando se fríen los alimentos; los hidrocarburos policíclicos aromáticos mostrados en el (Cuadro 4), se han identificado en estas condiciones. Muchos de ellos se han relacionado directamente con el cáncer en el colón y en la próstata de las personas que consumen excesivas cantidades de grasas muy calentadas (37).

Cuadro 4. Hidrocarburos policíclicos aromáticos presentes en alimentos.

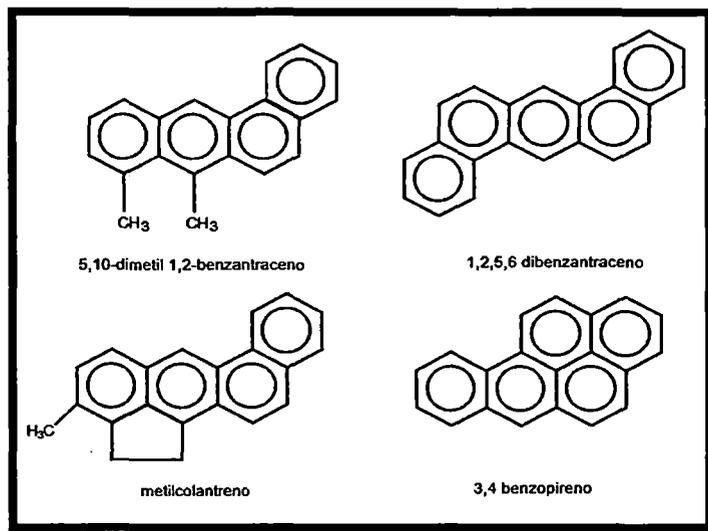
| Compuesto | Alimento |
|------------------------------|--------------------------|
| Benzantraceno | Productos ahumados como: |
| Benzofluorantreno | Carne de res |
| Benzoperileno | Quesos |
| Benzopireno | Aves |
| Criseno | Almejas |
| Metil criseno | Ostiones |
| Coroneno | Jamón |
| Dibenzantraceno | Salmón |
| Dibenzocriseno (antrantreno) | Salchichas |
| Fluorantreno etc | |
| Perileno | |
| Fenantreno | |
| Pireno | |
| Metil pireno | |
| Trifenileno | |

Fuente: Valle, Toxicología de los alimentos.

Las grasas son susceptibles de sufrir cambios durante su calentamiento, principalmente las poliinsaturadas, son fácilmente oxidadas durante la elaboración de frituras, como lo son: papas a la francesa, "carnitas", "chicharrón", etc.

Entre los compuestos generados por la termodegradación de grasas se encuentran los aromáticos policíclicos derivados del antraceno (Figura 12).

Figura 12. Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos.



Fuente: Valle, Toxicología de los alimentos

El contenido de hidrocarburo aromático cancerígeno puede variar de 20 a 100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ en grasas comestibles (aceites, margarinas y mantequilla) por ejemplo el 3,4 benzopireno fue detectado de 3 a 18 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (38).

En varias investigaciones para determinar el contenido de polímeros y monómeros de ácidos grasos cíclicos en diferentes tipos de aceite y diferentes prácticas de manejo, se ha reportado mayor aumento de estos compuestos cuando se fríen alimentos congelados sin adición de aceite fresco; el incremento se presenta cuando la temperatura de fritura está entre 200 y 220°C, a mayor número de frituras mayor es la formación, sin encontrar diferencias significativas entre el tipo de aceite utilizado. La mayor formación se da en aceite de girasol, seguido de aceite de girasol con alto contenido de ácido oleico y por último en

aceite de oliva extra virgen fresco, con formación de 85,5 mg, 70,6 mg y 68,5mg/100g de aceite, respectivamente . Al igual que para los compuesto polares, aún no hay un consenso en el número de frituras máximo para la utilización del aceite; se ha reportado que la formación de ácidos grasos cíclicos (polímeros y monómeros) aún es baja cuando se han realizado 20 frituras continuas de papas pre fritas en aceite de girasol, girasol con alto contenido de linoleico y oliva(39) .

2.2.5.1. Clasificación de la exposición a HAP como cancerígenos

Diversos organismos y agencias han establecido clasificaciones para determinar la carcinogenicidad de sustancias químicas. Actualmente la más aceptada es la clasificación de la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer, conocida por sus siglas en inglés IARC (International Agency for Research on Cancer). Es una agencia con sede en Lyon (Francia), dependiente de la Organización Mundial de la Salud(7).

La clasificación la IARC tiene cuatro grupos principales:

- **Grupo 1:** sustancias o exposiciones que son cancerígenos para el ser humano.
- **Grupo 2A:** sustancias o exposiciones que son probables cancerígenos para el ser humano. En general se clasifican en este grupo las sustancias que son claramente cancerígenas en experimentación animal pero para las que no hay suficiente información en los seres humanos.
- **Grupo 2B:** sustancias que son posibles cancerígenos para el ser humano. En general se clasifican en este grupo sustancias para las que no hay suficiente información en los seres humanos, y para las que hay pruebas que indican que pueden producir cáncer en animales de experimentación, pero no se puede concluir que sean claramente cancerígenos animales.

- **Grupo 3:** sustancias para las que no se dispone de suficiente información sobre su capacidad carcinogénica.
- **Grupo 4:** sustancias que probablemente no son carcinogénicas para los seres humanos.

Cuando una sustancia se clasifica en el grupo 1 significa que no hay duda sobre su potencial para producir cáncer. Deben promoverse acciones de protección de la salud y se deben establecer medidas regulatorias para prevenir la exposición a la misma (40).

2.2.5.2. Clasificación de la IARC para los HAP

Respecto a los HAP individuales la última actualización de la IARC ha establecido la siguiente clasificación (cuadro 5).

Cuadro 5: Clasificación de la IARC para los HAPs

| | |
|-----------------|---|
| GRUPO 1 | Benzo[a]pireno. |
| GRUPO 2A | Ciclopenta[c,d]pireno, Dibenzo[a,h]antraceno y Dibenzo[a]pireno. |
| GRUPO 2B | Benzo[j]aceantrileno, Benzo[a]antraceno, Benzo[b]fluoranteno, Benzo[j]fluoranteno, Benzo[k]fluoranteno, Benzo[c]fenantreno, Criseno, Dibenzo[a,h]pireno, Dibenzo[a,i]pireno, Indeno[1,2,3cd]pireno, 5-Metilcriseno. |

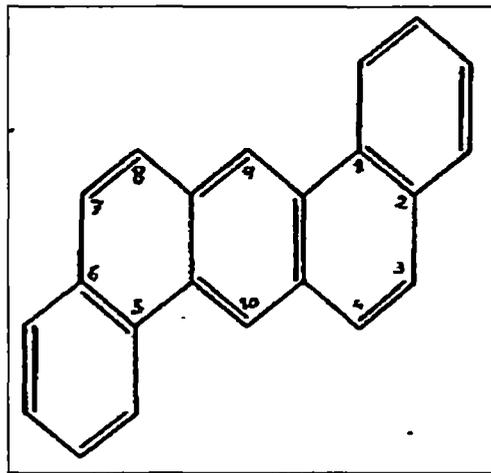
Fuente: OMS.

2.2.5.3. HAPs con mayor actividad cancerígena:

Pertenecen a este grupo el 1-2-5-6-dibenzantraceno (Figura 13), el 3,4 benzopireno, colantreno y metilcolantreno.

El 1-2-5-6-dibenzantraceno es el primer hidrocarburo policíclico en el que se observó actividad cancerígena. Este compuesto resulta de la adición en 5,6 de un núcleo bencénico a la molécula de 1,2-benzantraceno.

Figura 13: Estructura química del 1-2-5-6-dibenzantraceno

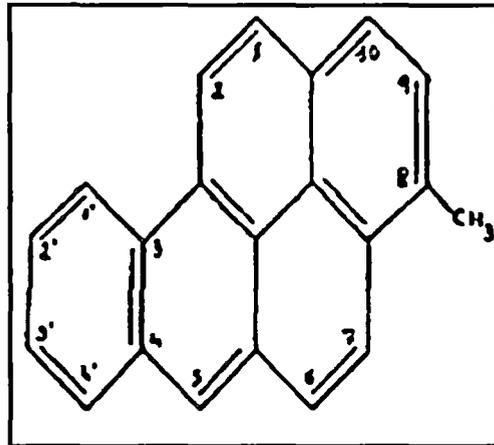


Fuente: Guzmán G.1955

En el estudio de todos estos hidrocarburos, se ha comprobado, que tiene una importancia extraordinaria el lugar de adición o acoplamiento, de un nuevo ciclo, sobre la estructura que hemos tomado como fundamental, pues, según la posición, la actividad cancerígena del compuesto resultante, queda incrementada o reducida, de tal manera que, por ejemplo, en el caso aquí considerado, si en vez de estar el nuevo ciclo en la posición 5-6, estuviera en la 7-8, el hidrocarburo con esta estructura presentaría un débil poder cancerígeno, que llegaría a anularse cuando dicho ciclo se encontrara en la posición 3-4. Otro hidrocarburo cancerígeno pentacíclico es el 3,4-benzopireno, que es el único hidrocarburo activo aislado del alquitrán de hulla, encontrándose también en el humo del tabaco. Es un hidrocarburo muy activo, siendo su poder cancerígeno casi dos veces superior al 1-2-5-6-dibenzantraceno.

Entre los derivados del 3,4-benzopireno, encontramos uno con una actividad, al menos igual a la del 3-4-benzopireno mismo; el 8-metil-3-4-benzopireno(Figura 14).

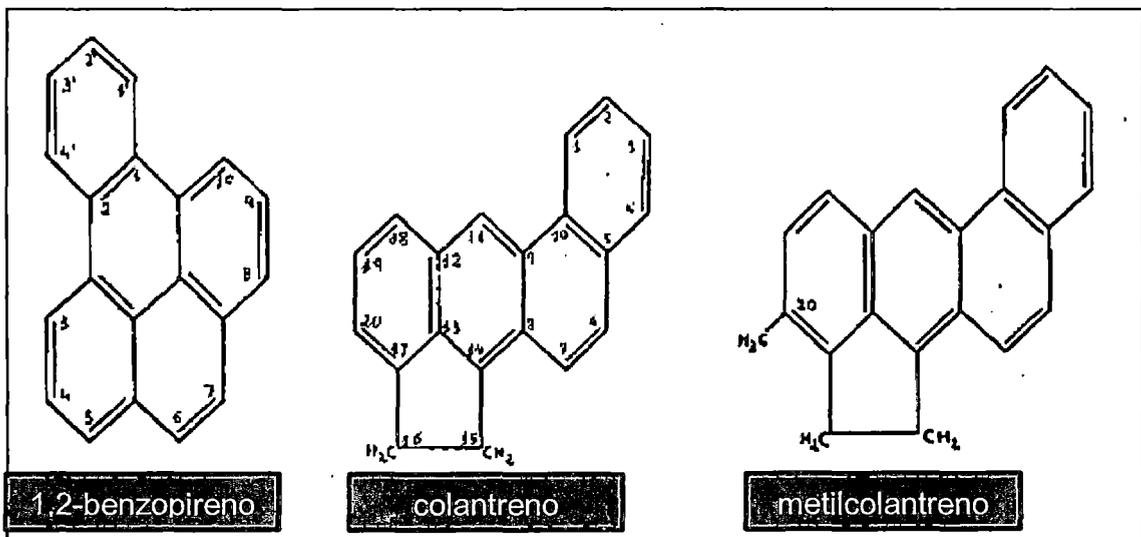
Figura 14: Estructura química del 8-metil-3-4-benzopireno



Fuente: Guzmán G.1955

El compuesto 1,2-benzopireno (figura 15), aislado de la brea, no muestra acción cancerígena, fenómeno de cambio de actividad paralelo al cambio de estructura.

Figura 15: Estructuras químicas de 1,2-benzopireno, colantreno y metilcolantreno.



Fuente: Guzmán G.1955

El colantreno y el metilcolantreno, en los que uno de los anillos es pentagonal, tienen una actividad cancerígena mayor aún que la del 3-4-benzopireno, pero son sustancias de fácil oxidación

2.2.5.2. Exposición a los HAPS: Tipos, niveles y concentraciones

El hecho de que el medio ambiente en general contenga HAP no implica que estos compuestos deban suponer un problema de salud para el ser humano. Para ello es necesario entrar en contacto con dichas sustancias y que éstas alcancen los tejidos del organismo. A esto es a lo que se refiere el concepto de exposición: cuando alguien está en una situación en la que el organismo recibe una determinada cantidad de un compuesto químico (sea o no perjudicial para la salud) se dice que está expuesto a esa sustancia.

2.2.5.4. Vías de exposición a los HAP

Los HAP pueden entrar al organismo por diferentes vías. Puesto que están presentes fundamentalmente en el aire contaminado la principal vía de entrada es respirando el aire que los contiene. Sin embargo también es posible ingerir sustancias contaminadas con HAP, y finalmente también cabe la posibilidad de que algunos HAP puedan ser absorbidos por la piel.

a) Exposición por vía inhalatoria: Los HAP pueden entrar al cuerpo a través de los pulmones al respirar aire que los contiene, generalmente adheridos a partículas o al polvo. El humo del cigarrillo, de la madera, del carbón y el humo proveniente de muchas áreas industriales contienen HAP. Las personas que viven cerca de sitios de desechos peligrosos también pueden estar expuestas por respirar aire contaminado por HAP. No se sabe con certeza la velocidad y el grado de absorción de los HAP en los pulmones.

b) Exposición por vía digestiva: Tomar agua o ingerir alimentos que contienen HAP es otra de las rutas por las cuales estas sustancias químicas pueden introducirse en organismo, pero generalmente la absorción de los HAP ingeridos es más bien lenta e incompleta.

c) **Exposición por vía dérmica:** En condiciones normales de exposición ambiental los HAP pueden entrar a través de la piel al entrar en contacto con partículas del suelo que contienen altos niveles de HAP, por ejemplo cerca de sitios de desechos peligrosos, o al contacto de la piel con aceite de motor u otros productos como la creosota, que contienen HAP. Algunos HAP son la base de medicamentos utilizados para el tratamiento de ciertas afecciones de la piel como el eccema, psoriasis y algunas dermatitis. La rapidez con la cual entran los HAP al cuerpo mediante la inhalación, el consumo de alimentos, la bebida o el contacto con la piel, puede ser influenciada por la presencia de otros compuestos a los cuales se está expuesto al mismo tiempo que a los HAP. Una vez en el organismo los HAP pueden llegar a todos los tejidos del cuerpo que contienen grasa, donde tienden a almacenarse. Así pues son más abundantes en el hígado, los riñones, y en general en los depósitos grasos del cuerpo, como el tejido adiposo.

También se acumulan, aunque en cantidades más pequeñas, en el bazo, las glándulas suprarrenales y los ovarios. Los tejidos del cuerpo transforman los HAP en muchas sustancias diferentes. La mayor parte de los HAP son eliminados del organismo en unos cuantos días, principalmente por la orina y las heces.

2.2.5.4. Formas y niveles de exposición a los HAP

Teniendo en cuenta las fuentes en las que se forman y originan los HAP, y las diferentes vías por las que pueden llegar al organismo, las poblaciones humanas pueden estar sometidas a cuatro tipos de exposición a los HAP: ambiental, dietética, del humo de tabaco, y ocupacional.

a) Exposición ambiental

Es más probable que en el medio ambiente la exposición se deba a los HAP volátiles del aire, o a los HAP que están adheridos al polvo y a otras partículas presentes en el aire. La vía de exposición es fundamentalmente inhalatoria, y las fuentes, como se ha descrito, son sobre todo los gases de los tubos de escape de los vehículos, las emisiones de los sistemas de calefacción que utilizan combustibles fósiles, los incendios forestales, y la incineración de desechos

industriales, agrícolas y domésticos. También es posible la exposición dentro de las casas, a partir de la combustión de madera y de productos de madera tratados con creosota.

Los HAP son ubicuos en el medio ambiente, dando lugar a niveles basales detectables en la población general. En el aire de las áreas rurales se han encontrado niveles de algunos HAP que oscilan entre 0,02 y 1,2 ng/m³ (nanogramos por metro cúbico; un nanogramo es una milmillonésima parte de un gramo). En áreas urbanas los niveles detectados varían de 0,15 a 20 ng/m³. Se han encontrado HAP en algunos abastecimientos de agua potable; las referencias de HAP en el agua potable oscilan entre 4 y 24 ng/L.

Para uno de los HAP más importantes, el Benzo[a]pireno, conocido por su abreviatura BaP, el nivel basal es próximo a 0. En los EEUU en áreas urbanas la concentración de BaP oscila entre 1 y 5 ng/m³. Las concentraciones actuales en las principales ciudades europeas (media anual) varían entre 1 y 10 ng/m³, mientras que en las áreas rurales es menor de 1 ng/m³. Las concentraciones han disminuido sustancialmente durante los últimos 30 años. La relación entre el nivel de BaP y otros HAP se conoce como el "perfil de HAP".

b. Exposición a partir del humo del tabaco

La exposición al humo del tabaco comporta el acceso al interior de los pulmones de una cantidad importante de HAP, junto con otras sustancias tóxicas, mediante la inhalación directa del humo por parte del fumador. Esta corriente de humo, abundante en HAP, es inhalado directamente al aspirar del cigarrillo y se conoce como la "corriente principal" (o mainstream). También se emiten al ambiente HAP contenidos en el humo que se emite a partir del cono de combustión del cigarrillo, conocido como la "corriente lateral" (sidestream). Mientras que para el fumador la inhalación de humo del tabaco es una forma de exposición directa y específica, para los no fumadores los HAP del humo del tabaco son un componente más de la exposición ambiental.

En los fumadores habituales sin exposición ocupacional la inhalación de HAP del humo del tabaco es la principal fuente de exposición a HAP. Se estima que un fumador de un paquete de cigarrillos diario ingiere entre 2 y 5 $\mu\text{g}/\text{d}$ (microgramos por día; un microgramo es la millonésima parte de un gramo, y equivale a mil nanogramos).

c. Exposición a partir de la dieta

Una gran parte de los alimentos que consumimos de forma habitual contienen HAP, aunque sea en cantidades mínimas. Los vegetales cultivados en suelos contaminados o en atmósferas contaminadas pueden contener trazas de HAP. También pueden encontrarse HAP en los alimentos a base de cereales y los lácteos. Cocinar carne y otros alimentos a altas temperaturas, lo cual ocurre al asar a la brasa o al carbón, aumenta las cantidades de HAP presentes en los alimentos. Lo mismo ocurre al ahumar los alimentos, sobre todo el pescado.

Diferentes estudios han permitido conocer, de forma aproximada, la concentración de HAP en algunos alimentos. Destacan por su contenido elevado en BaP los productos ahumados, en especial mediante técnicas tradicionales, como el pescado tailandés (hasta $1.200\mu\text{g}/\text{kg}$). Entre los alimentos no ahumados, los de mayor concentración son algunos pescados y mariscos, con concentraciones de hasta $5-7\mu\text{g}/\text{kg}$, y los que tienen alto contenido en grasas, como los aceites, con concentraciones a veces superiores a $2\mu\text{g}/\text{kg}$. El nivel de HAP del aceite varía notablemente según del fruto o semilla, la tecnología utilizada y el proceso de refinado. Es muy bajo en el aceite virgen de oliva, y algo mayor en el aceite refinado de otras semillas. El de orujo, resultante de extraer el aceite remanente en el hueso, debe someterse a procesos más agresivos y tiene un mayor riesgo de contener mayores concentraciones de HAP.

Se han establecido límites máximos tolerables de BaP para alimentos. Como muchas mezclas de HAP lo contienen en concentraciones parecidas a menudo se toma el BaP como referencia para el control de los HAP totales, de los que suele representar entre un 1 y un 15%. Para los alimentos que se consumen crudos la

UE ha fijado un límite máximo tolerable de $0,3\mu\text{g}/\text{kg}$. No se ha fijado un límite para alimentos ahumados, aunque en algunos países (Francia, Alemania, Suiza, Austria) han establecido valores de $1\mu\text{g}/\text{kg}$. En el aceite de orujo se han establecido límites para un grupo de ocho HAP (entre ellos el BaP); para cada uno el límite máximo debe ser menor de $2\mu\text{g}/\text{kg}$, y la suma de sus concentraciones no puede exceder de $5\mu\text{g}/\text{kg}$.

En la dieta típica en España de población adulta se ha estimado que la ingesta diaria promedio es de $8.6\mu\text{g}/\text{d}$, correspondiendo $0,14\mu\text{g}/\text{d}$ a la ingesta de BaP. Para el BaP, el 24% de la ingesta correspondía a carne y derivados, 20% a productos a base de cereales, y 11% a los aceites y otras grasas. En las poblaciones no expuestas ocupacionalmente y no fumadoras los HAP de la dieta constituyen la principal fuente de exposición.

d. Exposición ocupacional

En algunas personas la principal fuente de exposición a los HAP ocurre en el lugar de trabajo. La exposición ocupacional es principalmente por inhalación de gases y partículas, pero en algunos casos puede haber un fuerte componente de exposición de HAP por la piel, al entrar en contacto o manipular sustancias con un elevado contenido en HAP.

La exposición ocupacional puede considerarse como una forma de exposición ambiental, pero con unas características peculiares. La principal es que la exposición tiene lugar a concentraciones mucho mayores que la exposición ambiental. Por ejemplo, en industrias con exposición a HAP el BaP se encuentra a veces a concentraciones de 10 a $100\mu\text{g}/\text{m}^3$, cuando en el aire la concentración típica es del orden de pocos ng/m^3 . Es decir, que la exposición ocupacional puede ser de un orden de magnitud de 10.000 a 100.000 veces mayor que la ambiental. Por otra parte es una exposición que puede tener variaciones en su concentración, y que tiene lugar durante un período limitado de tiempo a lo largo del día y de la semana. Finalmente, con frecuencia la exposición ocurre en

lugares confinados, sometidos a condiciones no habituales de temperatura, y en muchas ocasiones con exposición concomitante a otros compuestos químicos.

La exposición laboral a HAP es muy común, existiendo un gran número de industrias y procesos en los que están presentes los HAP. En algunos casos la base de la exposición es a causa de la combustión de materia orgánica necesaria para un proceso determinado; en otros casos se debe a la utilización de productos ricos en HAP, y en otros casos la industria no tiene relación alguna con los HAP, pero la exposición es secundaria a otras situaciones habituales: por ejemplo, en casi todas las ocupaciones en las que se opera con maquinaria y vehículos de transporte las emisiones de los tubos de escape contienen HAP.

2.2.5.5. Descripción y fuentes del benzo(a)pireno en los alimentos

El b(a)p es un compuesto formado por cinco anillos de benceno fundidos, presenta un punto de fusión de 179°C y de ebullición de 495°C, es altamente volátil y soluble con los compuestos orgánicos lipofílicos. Se forma por la combustión incompleta de la materia orgánica (incendios forestales, carbón, petróleo), emisión de gases vehiculares, humo del cigarrillo y como derivado de varios procesos en la industria alimentaria y también en diferentes prácticas de cocción en el hogar (41) (42). Entre los procesos sufridos por los alimentos, en los cuales se ha evidenciado la formación de b(a)p se encuentran: el ahumado, el secado, el tostado, el horneado, la fritura, la extracción de aceites (secado directo y a altas temperaturas de las oleaginosas antes de extraer el aceite) y la termo degradación de lípidos, como en el caso de los aceites comestibles que se someten a temperaturas elevadas(43). De igual manera, se asocian con la formación de HAP, el método y tiempo de cocción de los alimentos, la fuente de energía utilizada, la proximidad de la misma con el alimento, las altas temperaturas y el tipo de combustible usado (maderas muy resinosas, con alto contenido de lignina, diesel o hule)(42). Debido a la formación del b(a)p en los alimentos, la ingestión de estos se convierte en una de las principales rutas de exposición(43).

2.2.5.6. Absorción y distribución del benzo(a)pireno

El b(a)p es liposoluble, lo que no solamente facilita su adherencia a la grasa de los alimentos, sino que también favorece su difusión y transporte a través de las membranas celulares de animales y más específicamente de los mamíferos. Cuando se ingiere con los alimentos se absorbe en el intestino, pero también puede ingresar al organismo por fuentes no alimenticias, por ejemplo, por medio de los pulmones al ser inhalado, debido a que el compuesto en mención es altamente volátil o por vía cutánea. Por ser insolubles en agua los lípidos requieren la formación de micelas con sales biliares para su digestión intestinal y posterior absorción de los productos de la misma (44). Debido a que la mayoría de los compuestos hidrofóbicos que ingresan al tracto gastrointestinal no pueden disolverse en el medio acuoso, por lo que algunos factores involucrados en los procesos de digestión y absorción de los lípidos de la dieta, tales como la presencia de sales biliares, también afectan la absorción de los HAP (45).

El b(a)p ingresa desde la luz intestinal hasta el enterocito mediante transporte activo, su captación se incrementa con la inducción del citocromo P 450 (isoformas: 1A1, 1B1), estas isoformas han sido localizadas en la membrana apical del enterocito y aumentan la velocidad de absorción del compuesto de interés favoreciendo su paso hasta la membrana basolateral(44). Se ha demostrado, utilizando células Caco 2, que el b(a)p es metabolizado en el intestino generando productos altamente tóxicos(47).

Cavret y colaboradores(48), reportaron que el b(a)p se hidroxila en el enterocito más rápido que otros compuestos (fenantreno 45%, pireno 65% y benzopireno 96%), en un tiempo de seis horas, explicado por su carácter lipofílico que muestra gran afinidad por el epitelio intestinal. Esta capacidad de la mucosa intestinal para metabolizar xenobióticos, entre ellos el b(a)p, puede fomentar la producción de metabolitos carcinogénicos en el sitio e incrementar el riesgo de cáncer intestinal (49). Después de ser absorbido por el intestino, el b(a)p pasa al torrente

sanguíneo y su captación tiene relación directa con el transporte unidireccional de los lípidos de la dieta (44)(48).

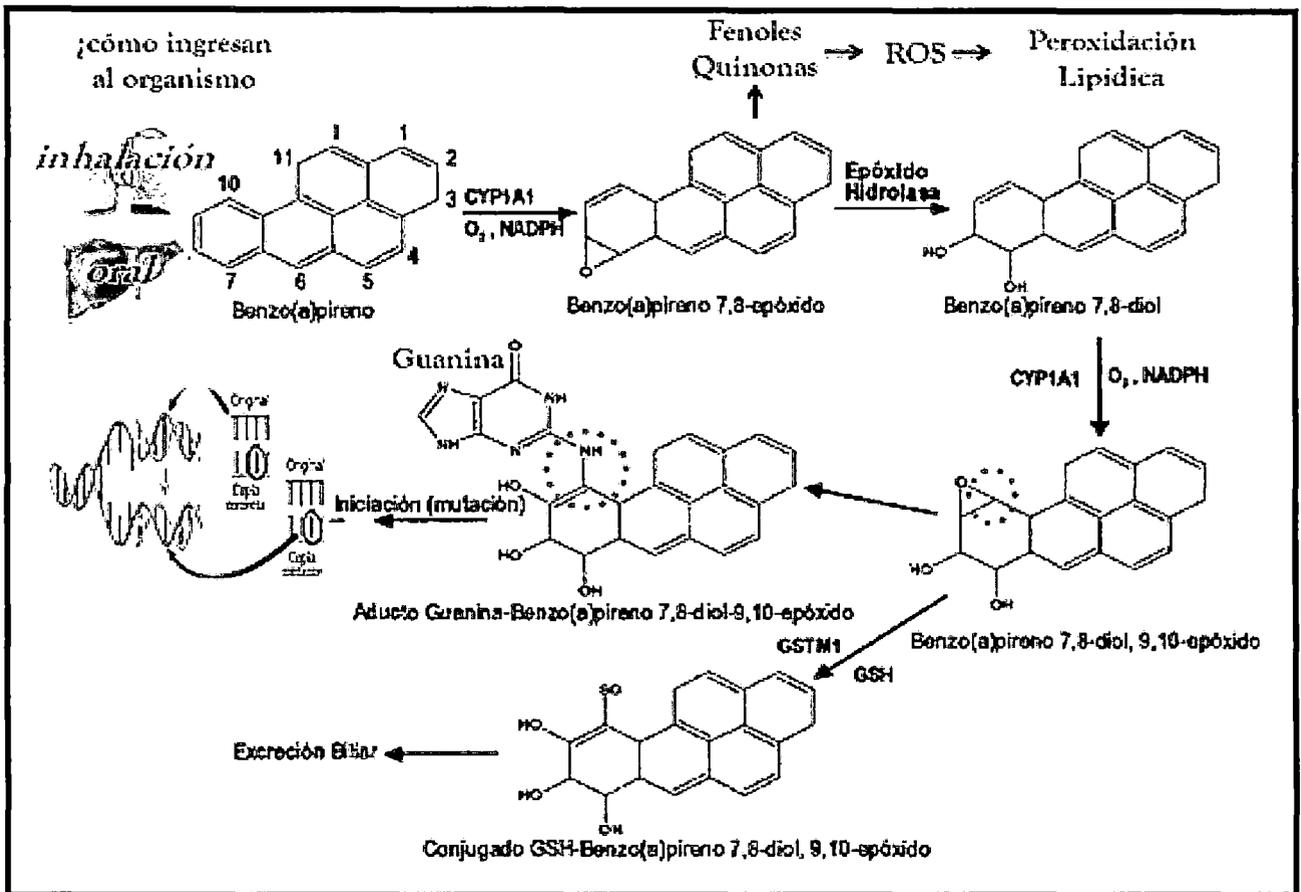
Aunque parte del b(a)p procedente de los alimentos se modifica en el intestino, su metabolismo es básicamente hepático y su principal ruta de eliminación es la bilis, a pesar de que también se elimina como metabolitos conjugados con el glutatión, el ácido glucurónico o sulfatos por vía fecal y urinaria (46). El b(a)p y sus metabolitos se distribuye desde el hígado hacia todos los tejidos, especialmente aquellos que tienen mayor contenido de grasas, se destacan los riñones, los pulmones, el cerebro y las mamas(50). Debido a la formación del b(a)p en los alimentos, la ingestión de estos se convierte en una de las principales rutas de exposición(44).

2.2.5.7. Activación orgánica del benzo(a)pireno y efecto carcinogénico

Se conocen varios caminos para la activación del b(a)p, sin embargo el más aceptado involucra al citocromo P450 con sus isoformas CYP1A1 y CYP1B1, que actúan en la región angular de la molécula sobre una zona de alta densidad electrónica, para formar compuestos conocidos como epóxidos (un epóxido es un radical formado por un átomo de oxígeno unido a dos de carbono, a su vez unidos entre sí por un átomo de carbono mediante enlace covalente) (46).

Los epóxidos pueden formar espontáneamente fenoles, y por acción de una prostaglandina H sintasa producir quinonas, que al ser atacadas por una quinona reductasa generan derivados de quinonas o pueden conjugarse con el glutatión, sulfato o el ácido glucurónico. Los epóxidos formados también pueden ser atacados por la enzima epóxido hidrolasa, para producir dihidrodioles, los cuales a su vez se pueden oxidar por las isoformas 1A1/1B1 del citocromo P450, generando fenoles dihidrodioles y dihidrodiol epóxidos, estos últimos se pueden hidrolizar a tetroles, conjugarse con glutatión o causar una modificación covalente de macromoléculas celulares, dando lugar a respuestas mutagénicas y cancerígenas (46)(51)(52) .(Figura 16)

Figura 16. Metabolismo hepático del benzo(a)pireno. Se muestra la activación del benzo(a)pireno y su conversión en diversas sustancias potencialmente tóxicas, como epóxidos, dioles, fenoles, quinonas y sustancias reactivas al oxígeno



. Fuente: Adaptado de Quiñones (53).

La estereoquímica de los dihidrodiol epóxidos derivados del b(a)p desempeña un papel importante en la toxicidad asociada con este último. El (+) anti-benzo(a)pireno-7,8-dihidrodiol-9,10-epóxido es el estereoisómero que ha mostrado tener la mayor reactividad, la más alta actividad de iniciación de tumores y ser el metabolito predominante en la formación de aductos con el ADN en los tejidos de los mamíferos (53)(46).

El (+) anti-benzo(a)pireno-7,8-dihidrodiol-9,10-epóxido puede sufrir una escisión carbono-oxígeno, provocando la apertura del anillo para formar un ión carbonilo en el carbono 10, es decir un átomo de carbono con carga positiva. Los iones carbonilo son especies muy reactivas que reaccionan con nucleófilos, tales como el ADN y las proteínas, para formar aductos covalentes (54),(55).

Wei y colaboradores, confirmaron la formación de aductos del DNA con diversos metabolitos del b(a)p. El 8-hidroxi del (+) anti-benzo(a)pireno-7,8-dihidrodiol-9,10-epóxido, se puede unir al nitrógeno de la posición tres de la guanina y al átomo de oxígeno de la desoxirribosa. Los enlaces de hidrógeno del 7-hidroxi, del compuesto (+) anti-benzo(a)pireno-7,8-dihidrodiol-9,10-epóxido, se pueden unir a los átomos de hidrógeno en los nitrógenos en las posiciones uno y dos de la guanina y al átomo de oxígeno de la citosina formando aductos. Cuando los aductos no se corrigen debidamente por el sistema de reparación del ADN, lo pueden dañar e incluso inducir mutaciones (56) (57), estas se han encontrado en el gen p53 (gen guardián), considerado indispensable para inducir la respuesta de las células ante el daño del ADN, deteniendo el ciclo celular en caso de mutaciones. Por su función en la apoptosis y el control del ciclo celular ante daños del ADN, se le conoce como gen supresor de tumores. Cuando este se altera puede permitir la proliferación de células anormales, dando como resultado cáncer. En tumores producidos por metabolitos del b(a)p se han encontrado mutaciones del gen p53 en los axones 157, 248 y 273(58) (59).

Algunos metabolitos del b(a)p se ligan covalentemente con el ADN y el ARN induciendo a la neoplasia y a la interacción macromolecular (60); siendo este el primer paso de la tumorigénesis y mutagénesis. Dichos metabolitos también pueden reaccionar con proteínas, como fue demostrado en peces por Helleberg y Prados (61), quienes encontraron que el isómero diol-epóxido se puede unir con proteínas hepáticas citosólicas y microsomales como la albúmina y la globulina. El 3-hidroxi-benzo(a)pireno se puede unir a la hemoglobina y a la albúmina en células de bovinos(62). De igual manera, reacciones de oxidorreducción

generadas por quinonas, derivadas del metabolismo del b(a)p, podrían llevar a la formación de especies reactivas de oxígeno, las que pueden contribuir a transformaciones oncogénicas(46)(63), estas especies reactivas de oxígeno pueden inducir la peroxidación lipídica que cataliza la oxidación de dioles a diol-epóxidos y estos a su vez tienen la posibilidad de unirse al ADN y a las proteínas(64).

2.2.5.8. Estudios experimentales en animales sobre benzopireno

El b(a)p ha sido catalogado como un tóxico reproductivo que afecta la fertilidad en ratas y otras especies de animales, debido a que los metabolitos resultantes interfieren con la función normal del ovario (65)(66).Tsai-Turton y colaboradores (67), en el año 2007, evaluaron la acumulación de metabolitos del b(a)p en microsomas de hígado y testículo de ratas, hámster y cerdos, encontrando que varios de estos interfirieron con la formación y función de los gametos, contribuyendo así a la infertilidad.

En tejidos celulares de hígado y ovario de varias especies (ratas, ratones, cabras, ovejas, cerdos y vacas) se pudo observar que al exponerse a 5 µg/g de b(a)p los metabolitos resultantes se adhieren al receptor de estrógenos, reduciendo la actividad de estos; la exposición prolongada al b(a)p provoca un secuestro de estos en las lipoproteínas de alta densidad que son esenciales para la biosíntesis de hormona esteroidea en el ovario, conduciendo a la reducción de la secreción de gonadotropinas, como la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH), con resultados negativos en las etapas finales del desarrollo folicular, disminuyendo la fertilidad (68)(69).

Wester y colaboradores(70), demostraron el potencial carcinogénico del b(a)p ingerido oralmente, estos investigadores expusieron 104 ratas Wistar durante cinco días a la semana a cantidades de 0, 3, 10 o 30 mg de b(a)p por kg de peso corporal, durante dos años y posteriormente les realizaron estudios histopatológicos. Los resultados mostraron el desarrollo de tumores en el hígado

en 99 de las 104 ratas, con una dosis estimada de 3-5 mg/kg, con un intervalo de confianza del 90%; de igual manera mostraron sarcomas en tejidos blandos, como piel y mamas con dosis de 10 mg/kg. Los tumores de piel al igual que los del hígado se consideran relevantes para el ser humano en dosis altas. También, los investigadores pudieron detectar en 13 ratas tumores en el intestino delgado, lo que debe considerarse en el ser humano, por la actividad local de los benzopirenos en el intestino; se concluyó que la exposición a 3 mg de b(a)p por kg de peso aumenta el riesgo de cáncer por exposición oral.

Otros estudios en animales demostraron que los HAP pueden causar cáncer en el pulmón (71)(72), en la piel y la vejiga(73)(74), lo mismo que en el esófago y el estómago (75).

En un estudio efectuado en la India, sobre aceites de fritura de pescado reutilizados, se realizó un análisis por medio de cromatografía líquida HPLC y se evidenció la presencia de varios HAP, en total 685 µg /kg de aceite; de estos 497 µg /kg eran b(a)p; se expusieron microsomas hepáticos de ratas a esta sustancia, dando como resultado alta expresión de metabolitos hepáticos y formación de aductos, que, como se mencionó, pueden causar alteraciones en la estructura del DNA, lo que puede dar lugar a mutaciones y transformación maligna de las células (76).

Ozaki y colaboradores(77) evaluaron el efecto del b(a)p en el tejido cervical de ratas hembras, a las cuales se les administró concentraciones de 2,5; 5 y 10 mg/kg de dicho compuesto, disuelto en aceite de sésamo por vía oral y peritoneal por un periodo de 14 semanas y que fueron comparadas con un grupo de ratas hembras control que no tuvo ningún tipo de administración y un grupo denominado vehículo al que solo se administró por las vías anteriormente mencionadas, aceite de sésamo. Finalmente, se pudo demostrar que el tratamiento con b(a)p resulta en efecto tóxico sobre el cuello uterino, evidente a medida que aumenta el daño en el ADN y la expresión del gen p53. El b(a)p

parece tener potencial para causar mutación del gen *p53* en el cuello uterino de los ratones.

Los resultados sugieren que el b(a)p puede llevar a la ruptura de un filamento del DNA o inducir a mutaciones, siendo ambos eventos capaces de inactivar genes supresores de tumores, como el gen *p53* (56) , y se ha demostrado que una disminución en la función de este gen puede resultar en un amplio espectro de tumores malignos (77).

2.2.5.9. Estudios en humanos

Los estudios en humanos sobre los efectos nocivos del b(a)p asocian la exposición por vía oral a altos niveles de esta sustancia, con el incremento de la toxicidad reproductiva femenina(49)(78). Los HAP pueden atravesar la placenta. Perera y colaboradores(79)evaluaron la formación de aductos con el ADN después de una ingesta entre 0,5 y 15 ng/m³ de HAP en 867 madres y 822 recién nacidos en el norte de Manhattan, World Trade Center y sus alrededores, Polonia y China. Los resultados indican claramente la formación de aductos entre los HPA y el ADN, concluyendo que el feto en desarrollo puede ser diez veces más sensible que la madre al daño del ADN inducido por los HPA; según autores esta mayor susceptibilidad fetal a daños genéticos podría deberse a mayor absorción y retención de sustancias tóxicas por el feto, reducción de la desintoxicación y menor posibilidad de reparación del ADN, mayor tasa de proliferación celular durante las etapas de desarrollo y menor competencia inmunológica del feto.

Herbstman y colaboradores(80), midieron la exposición ambiental a HPA, en 164 mujeres gestantes no fumadoras, utilizando monitores personales de aire, y cuantificaron la eliminación urinaria de metabolitos de HAP. Los resultados revelaron que la exposición prenatal a HPA, incluyendo el b(a)p, en concentraciones entre 0,24 y 2,47 ng/m³, altera la metilación del ADN, proceso que puede influir en la formación de aductos con el ADN. Aunque se requieren

más investigaciones para explicar la compleja acción molecular de la formación de aductos durante el periodo prenatal y las implicaciones para el feto de la ingesta oral de la madre de b(a)p, hay la posibilidad de que el b(a)p atraviese la barrera placentaria, y por tal motivo es posible que cuando la madre ingiera alimentos con alto contenido de HAP, los metabolitos de estos puedan llegar directamente al feto.

2.2.5.10. Cuantificación de benzo(a)pireno en alimentos

La ingestión de alimentos es una de las mayores fuentes de exposición al b(a)p. Kaseuroni y colaboradores, cuantificaron mediante cromatografía de capa fina y espectrofluorimetría la cantidad de estos compuestos formada en los alimentos, los resultados revelaron que la mayor concentración de estos estaba en 112 g de filete de res asado al carbón y sometido a altas temperaturas (544 ng); seguido por 96 g de pollo con hueso y piel sometido al mismo método de cocción y temperatura (439 ng); en tanto que, una hamburguesa de res de 85 g, con el mismo método de cocción (no se define el valor de temperatura) contenía 129 ng, valor todavía más bajo fue encontrado en igual cantidad de hamburguesa asada en el horno a baja temperatura (0,8 ng). Los autores concluyeron que la cantidad de b(a)p formado depende del tipo de alimento, el tiempo de cocción, la fuente de energía utilizada y la proximidad de la misma con el alimento.

Djinovi y colaboradores, en el año 2008(81), cuantificaron por medio de cromatografía de gases y espectrometría de masas la cantidad de b(a)p formado durante el asado de la carne, cuando se utilizaba carbón procedente de diez tipos de madera distintos, los investigadores concluyeron que efectivamente el tipo de madera empleada en el asado influye sobre la cantidad formada de este compuesto en la carne, los valores más bajos se encontraron con las maderas de manzano y aliso (6,04 µg/kg) y los más altos, cuando se utilizó la madera de pino (*Picea conifera*) (en el intervalo de 47,9 µg/kg y 470,91 µg/kg).

Wretring y colaboradores(82), en Suecia cuantificaron mediante la misma técnica de laboratorio empleada en los dos estudios anteriores la cantidad de b(a)p en 38 muestras de carne y 39 de pescado ahumando. Los resultados revelaron que en nueve de las muestras de carne de res ahumada las concentraciones eran muy altas (6,6-36,6 mg/kg), lo mismo que en seis de las muestras de pescado ahumado (8,4-14,4 mg/kg), valores que están por encima del permitido por la CE para este tipo de alimentos (5 mg/kg). Por el contrario, cuando los pescados y las carnes fueron sometidos a métodos de cocción con calor indirecto y sin ahumado, las concentraciones de b(a)p fueron muy inferiores a 5 mg/kg (83).

Essumang y colaboradores (84), en el año 2012, cuantificaron mediante cromatografía de gases el b(a)p contenido en 108 muestras de pescados ahumados, incluyendo sardinas y arenques, en los que encontraron concentración de 11,4 µg/kg, valor muy por encima del permitido por la CE . Los autores, resaltan el peligro de consumir pescado ahumado, por las altas concentraciones encontradas de HAP, entre ellos el b(a)p, debido al potencial cancerígeno de los mismos. Cuando se asa una carne, la grasa de esta cae sobre el carbón caliente produciendo su combustión incompleta, a su vez el carbón despliega una columna de humo que contiene HAP, entre ellos b(a)p, contaminando el alimento.

Cavret y colaboradores (48) cuantificaron el contenido de b(a)p en leche y productos lácteos y reportaron concentraciones entre 1,5 y 7,5 mg/kg. En múltiples estudios se han podido medir las cantidades de b(a)p en los alimentos, incluso en varios de estos las cantidades superan las concentraciones máximas permitidas por la CE (83). Es evidente que la ingesta de alimentos se convierte en una de las principales rutas de exposición al b(a)p para el ser humano.

2.2.5.11. Benzo(a)pireno en los alimentos, normativa vigente

No se encontró reglamentación vigente para Perú sobre las concentraciones máximas de b(a)p permitidas en los alimentos. Algunos organismos internacionales han presentado propuestas al respecto; desde el año 2002, la CE con base en las investigaciones estimó que la ingesta máxima de b(a)p proveniente de los alimentos era de 420 ng por persona, equivalente a entre 6-8 ng/kg/día para una persona con un peso de 70 kg. Este valor es cerca de cinco a seis veces menor que las dosis capaces de producir tumores en animales de experimentación (83).

La CE ha reglamentado varios aspectos; la regulación N° 1881 de 2006, (ver cuadro 6), en su sesión N° 6, específica para HAP, regula la concentración máxima de b(a)p en µg/kg peso fresco, para diferentes alimentos (83). La regulación antes mencionada fue modificada por la N° 835 de 2011 de la CE(Comisión Europea,2011); la modificación se debió a que hasta la fecha se había considerado el b(a)p como el principal marcador de la toxicidad de los HPA; sin embargo en el año 2008, el Comité FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios recomendó no solo al b(a)p como marcador sino la suma de 4 HAP: b(a)p + criseno + benzo(a)antraceno + benzo(b)fluoranteno)(43). El Codex Alimentario en el año 2009 propuso el código de prácticas para reducir la contaminación por HPA en los alimentos producidos por ahumado o secado directo(88); sin embargo, en este no se presta atención a las concentraciones finales de dichos compuestos en los alimentos.

Cuadro 6. Contenido máximo de benzo(a)pireno permitido en alimentos.

| Producto alimenticio | Contenidos máximos($\mu\text{g}/\text{Kg}$ fresco) |
|--|--|
| Aceites y grasas(excluida la manteca de cacao) destinados al consumo humano. | 2.0 |
| Carnes y productos cárnicos ahumados. | 5.0 |
| Carne de pescado y productos pesqueros ahumados. | 5.0 |
| Carne de pescado no ahumada. | 2.0 |
| Crustáceos y cefalópodos, no ahumados. | 5.0 |
| Moluscos bivaldos | 6.0 |
| Alimentos elaborados a base de cereales y alimentos infantiles | 1.0 |

Fuente: Comisión Europea (CE).Regulación N° 835/2011.

2.2.6. Métodos analíticos para determinar HAPs en aceites de origen vegetal

Uno de los principales problemas para la determinación de HAPs en aceites es la complejidad de la matriz, sus bajos niveles de concentración y los múltiples compuestos interferentes. Se han planteado múltiples formas de extracción de los analitos de interés y eliminación de estas interferencias previa a su determinación cromatográfica. Para el paso de la extracción se ha recurrido a la partición líquido-líquido, micro extracción en fase sólida (SPME), extracción con fluidos supercríticos (SFE) , micro extracción en fase sólida desde el espacio de cabeza o "head space" (SPME-HS) y extracción en fase sólida (SPE) (84).

Para la limpieza o "cleanup" también se han sugerido distintos tratamientos de muestra para esta etapa como la cromatografía de permeación en gel (GPC) y

algunas que implican SPE con sorbentes de florisil, silica y C18 . Las desventajas de varias de estas técnicas son los largos tiempos para la preparación de la muestra previa a su análisis que se incrementa con el número de muestras a analizar.

Entre los métodos cromatográficos para determinar la presencia y concentración de los HAPs, existen dos mayormente utilizados. Estos son la cromatografía líquida de alta resolución con detección por fluorescencia (HPLC-FLD) (84) (Obiedzinski 2013) y la cromatografía de gases (GC) acoplada a un espectrómetro de masas (MS).

A pesar de que ambos métodos son selectivos y con bajos límites de detección, los tiempos de medición son largos y para el caso de HPLC-FLD se requieren de grandes volúmenes de solventes de alta pureza, por lo cual son costosos y eliminan una cantidad importantes de desechos.

Operaciones en el análisis de HAPs

La técnica de extracción más antigua es la extracción líquido-líquido. Mediante el reparto selectivo de los analitos (HAPs) entre la fase acuosa de la muestra y un disolvente orgánico se logra la extracción deseada:

Los disolventes más usados en la extracción líquido-líquidos son el ciclohexano, el diclorometano y n-hexano. Son todos disolventes orgánicos, debido a que deben disolver a las moléculas de HAPs, cuya naturaleza es apolar.

Respecto a otras técnicas de extracción, las principales desventajas de la extracción líquido-líquido son los mayores consumos de disolvente (que después pasan a ser residuos), el mayor consumo de tiempo y el trabajo que conlleva el proceso. Sin embargo, existen estudios que muestran mejores recuperaciones cuando utilizamos extracción líquido-líquido en comparación con la extracción en fase sólida.

Existen numerosas variaciones de este método en la bibliografía, en las que se prueban otros disolventes para realizar las extracciones, como el ciclohexano.

Respecto a las fases móviles más comúnmente empleadas suelen ser mezclas de disolventes que disuelvan bastante bien todos los HAPs presentes en la muestra pero también deben dejar interactuar a las moléculas de hidrocarburos con la fase estacionaria para que se lleve a cabo la separación, además de no interferir en la detección final. Las mayores variaciones se dan en los programas de elución y en las mezclas de acetonitrilo/agua utilizados para realizar la separación:

Una vez disueltos los HAPs en la fase móvil se separan en una columna de fase reversa C18 utilizando un programa de elución adecuado. Su presencia se pone de manifiesto mediante la utilización de dos detectores conectados en serie: primero un detector de absorción UV y a continuación uno de fluorescencia.

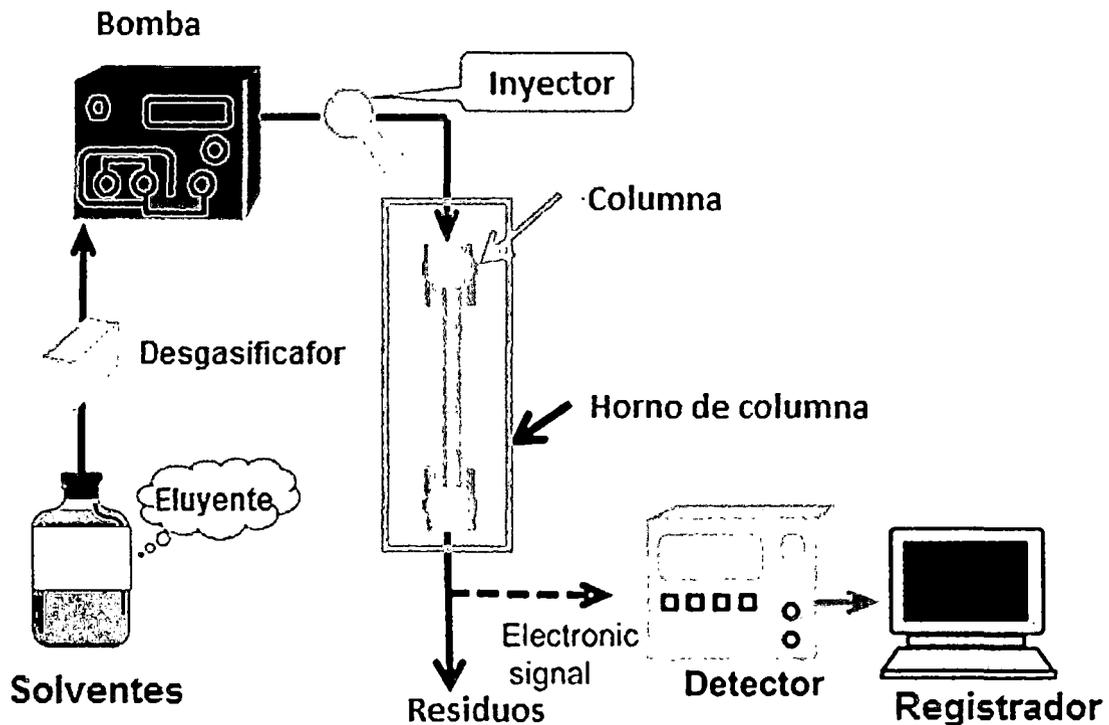
Según el orden de salida de los HAPs (que depende de la fase estacionaria y de la fase móvil empleada, así como de su programa de elución), se programará el detector de fluorescencia para recoger las señales con mayor sensibilidad para cada molécula de HAP.

2.2.6.1. Determinación de 3,4 benzopireno por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

- Fundamento de la técnica:

En la cromatografía líquida de alta resolución los componentes de la muestra se distribuyen entre una fase móvil (el disolvente) y una fase estacionaria (el relleno de la columna).(Figura 17).

Figura 17: Esquema de un equipo de HPLC



Fuente: (Moret,2002).

La HPLC tiene su origen en la cromatografía en columna clásica aunque tanto sus fundamentos como su desarrollo son similares a la cromatografía de gases. En este caso es la habilidad con que los constituyentes de la muestra se reparten entre las dos fases lo que condicionará la separación. La HPLC es comparable a la GC en velocidad, eficiencia y resolución y es inherentemente más versátil. No está limitada

a muestras volátiles y térmicamente estables, y la elección de la fase estacionaria incluye sólidos adsorbentes, adsorbentes modificados químicamente, cambiadores iónicos y materiales porosos, dando lugar a distintas modalidades. Además, una elección mucho más amplia de fases móviles que en GC facilita una variación muy considerable en la selectividad del proceso. Dependiendo de la naturaleza de la fase estacionaria, se pueden distinguir cuatro modos diferentes:

- a) Cromatografía de adsorción.- donde la separación se basa en repetidos pasos de adsorción-desorción.
- b) Cromatografía de partición, basada en la partición entre la fase móvil y la estacionaria.
- c) Cromatografía de cambio iónico, en la que la fase estacionaria está compuesta por una superficie iónica de carga opuesta a la de la muestra.
- d) Cromatografía de exclusión por tamaños, donde la muestra se separa de acuerdo a su peso molecular a través de la columna rellena de un material con un tamaño de poro controlado.

La cromatografía de partición es la más ampliamente utilizada y en la práctica, pueden diferenciarse dos modalidades, dependiendo de la polaridad de las dos fases

- Cromatografía en fase normal, donde la fase estacionaria es de naturaleza polar y la fase móvil es apolar. En este caso, las muestras polares son retenidas más fuertemente por la columna permitiendo, por tanto, la elución de componentes apolares en primer lugar.
- Cromatografía en fase inversa, donde la fase estacionaria es de naturaleza apolar y el disolvente de elución o fase móvil es polar. En este caso ocurre lo contrario que en fase normal, los compuestos apolares serán retenidos durante más tiempo en la columna.

En cromatografía líquida suelen usarse como fase móvil mezclas de disolventes. Cuando la composición de la fase móvil se mantiene constante a lo largo del desarrollo cromatográfico, se denomina elución en modo isocrático. Por otro lado, cuando la composición de la fase móvil varía, se conoce como modo de elución en gradiente.

Los detectores más ampliamente utilizados son aquellos basados en la absorción de radiación UV/visible por los solutos y los que monitorizan las diferencias en el índice de refracción entre los solutos disueltos en la fase móvil y la fase móvil pura.

Otros detectores que son más selectivos en su respuesta dependen de propiedades específicas de cada soluto como fluorescencia, conductividad eléctrica, corrientes de difusión y radiactividad y especialmente espectrometría de masas.

- Método de adición de estándar

Es una metodología que nos permite hallar la concentración de sustancias que se encuentran en una pequeñísima proporción del total de la muestra: cuánto más bajo resulta su concentración, esta será medida con un margen de error mayor. Asimismo, como bien señalaba José Manuel López Nicolás , no es lo mismo hacer un análisis de una sustancia sola que dentro de una matriz como podría ser la leche, sangre, aceites ,o cualquier muestra compleja en la que se puedan dar interferencias: es decir, dificultar la fiabilidad del análisis. Para ello, podemos usar el método de las adiciones estándar: tomamos un volumen fijo de muestra, al que adicionamos un estándar (sustancia que queremos medir en estado puro) muy concentrado (para añadir solo un volumen pequeño, del orden de microlitros y así evitar el efecto dilución).

Este método se utiliza para análisis de trazas .Diferentes cantidades del analito que se desea medir se adicionan a la solución problema, la cual contiene una concentración desconocida de analito. A la cuantificación total se le resta el valor de la cantidad adicionada; de esta manera se puede calcular la concentración desconocida (85).

2.2.7. TEST QUÍMICOS RÁPIDOS DE DETECCIÓN DE CALIDAD

Debido a la poca precisión para recomendar el número de frituras y el tiempo de uso de los aceites y mantecas, en la actualidad existe una gran variedad de test químicos de fácil manejo y de determinación rápida para conocer la calidad de los aceites y mantecas. Entre los test más utilizados están el Fritest® y el Oxifrit®. El Fritest® consiste en llenar con aceite caliente un tubo de ensayo que contiene un reagente hasta la línea indicada. El tubo se tapa y agita y luego de un minuto se contrasta el color del aceite, en una escala de cuatro colores.

Se recomienda que el aceite debe ser cambiado en el color 3. El Oxifrit® consiste en un tubo de ensayo con un reagente, al cual antes de adicionarse el aceite debe adicionarse cinco gotas de un segundo reagente, se tapa, se agita y se contrasta con una escala de tres colores; el laboratorio recomienda el cambio cuando el color es el número dos (verde)(86).

Otras pruebas de calidad como el monitor de grasa LRSM®, una tirilla de papel blanco que tiene cuatro bandas azules que pueden cambiar de color después de la inmersión en el aceite y el Advantec®, tira plástica con un agente indicador, no son considerados buenos indicadores de calidad del aceite ya que solo determinan el contenido de ácidos grasos libres y no los compuestos indicador de calidad.

La aplicación de estos test ha sido señalada como válida para la evaluación de la vida útil de los aceites, reportando correlación significativa con el material polar. Sin embargo, depende del tipo de test. Dobarganes y Márquez-Ruiz encontraron un bajo número de falsos positivos y negativos en la valoración de aceites de fritura utilizando los test Verifry® y Oxifrit®.(87)

Cuadro 7. Test químicos rápidos de detección de calidad del aceite.

| Tipo de test | Laboratorio | Determinación |
|---------------------|-----------------------|---|
| Oxifrit ® | Merck | Compuestos polares |
| Fritest ® | Merck | Alcalinidad |
| PCM ® | Mir-oil | Compuestos polares |
| ACM ® | Mir-oil | Alcalinidad |
| Av-Check ® | Advantec | Ácidos grasos libres |
| LRSM ® | 3M | Ácidos grasos libres |
| TPM, FFA, WET ® | Test kit technologies | Ácidos grasos libres, Compuestos Polares y detergentes y surfactantes suspendidos en sales y agua |

Fuente: Valle, Toxicología de Alimentos

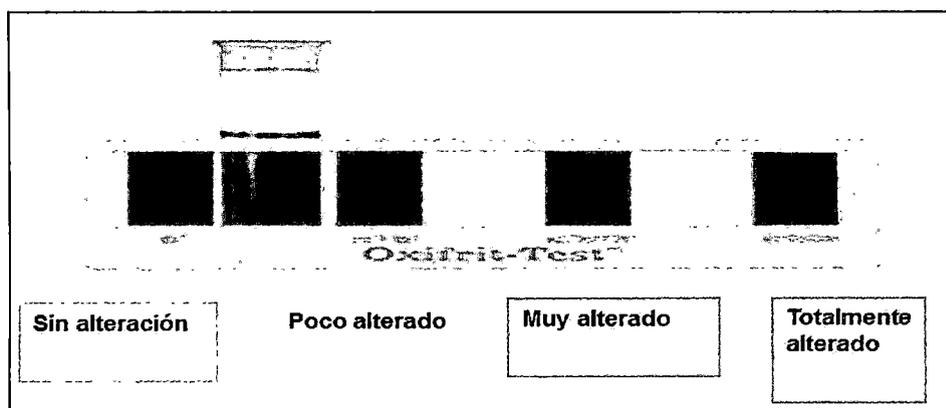
En el mercado también se pueden encontrar instrumentos portátiles de medición instantánea, algunos pueden ser utilizados en forma similar a un termómetro digital; uno de los más comunes, el Fri-Check® mide simultáneamente la viscosidad, densidad y tensión superficial, para luego correlacionar estas variables y obtener el contenido de compuestos polares en los aceites, se recomienda que los resultados obtenidos sean multiplicados por 1,25 para obtener una aproximación más real. Otros instrumentos son el Food Oil Sensor® (FOS), el FOM 200® (Food Oil Monitor), el Optifry® y el Tes- to 265®, todos miden el contenido de compuestos polares en un rango de 0 a 45% con diferencias en la precisión, la resolución y la temperatura óptima del aceite para la medición (87).

2.2.7.1. Fundamento químico del Oxifrit-Test:

El oxifrit-test es un kit basado en el ensayo de Perevalov modificado, que usa un indicador redox que cambia de color al aumentar la cantidad compuestos de oxidación.

Es un método rápido por colorimetría según el principio de la determinación de ácidos grasos oxidados con indicadores de color (reactivo1: alcohol , reactivo 2: hidróxido de potasio en solución), que van del azul al verde oliva. Se trata de un Kit con el cual se mide el grado de deterioro de los aceites por medio de una estimación visual de la coloración resultante, que se compara con una escala de colores suministrada por el fabricante del kit(figura 18).

Figura 18: Estimación visual de la coloración resultante en el kit del Oxifrit-test.



Fuente: Merck.

2.2.8. CARACTERÍSTICAS SENSORIALES DE LOS ALIMENTOS FRITOS QUE DETERMINAN LA CALIDAD DEL ACEITE.

Se cree que existe una relación estrecha entre las características sensoriales de los alimentos cuando son fritos en aceites con diferentes contenidos de compuestos polares, no hay evidencia de que las características sensoriales de los alimentos sean un buen predictor de la calidad del aceite. Billek analizó más

de 400 grasas de fritura y comparó su contenido de compuestos polares con el análisis sensorial por parte de un panel de jueces, reportando que el aroma y gusto de las grasas que contenían entre 25 y 30% de componentes polares eran aún aceptables, pero cuando sobrepasaba el 30%, las características eran consideradas inaceptables(88). Sin embargo, se sabe que la fritura de los alimentos en aceite fresco muestra la apariencia de un alimento crudo, ya que estos no pardean y se cree que a medida que aumenta el contenido de compuestos polares aumenta la intensidad en el color del alimento, hasta que éste se torna demasiado oscuro sin llegar a la cocción en el centro del alimento, como puede verse en el cuadro 8.

Cuadro 8: Características sensoriales de los alimentos fritos en aceites con diferente composición de compuestos polares.

| Contenido de compuestos polares del aceite. | Características sensoriales de los alimentos. |
|--|---|
| 1-3 % | Con aceite fresco el alimento se fríe con muy poco o sin ningún color. Muchas Personas piensan que el alimento está crudo. |
| 4-9 % | Los alimentos tienen un pequeño color dorado oro y es libre de excesos de grasa. El centro del alimento se cocina completamente. |
| 10-15 % | El alimento tiene un color oro oscuro .El aceite comienza a declinar en calidad. |
| 16-22 % | L superficie del alimento tiene un color oscuro pero la cocción en el centro del alimento se hace más difícil. La vida útil del aceite está por terminar. |
| Mayor a 25% | La superficie del alimento es oscura, además, el alimento queda con un exceso de aceite. Por lo general, el centro del alimento no está cocido, por ejemplo el "hueso del pollo es rojo". |

Fuente: Valle, Toxicología de Alimentos

2.2.9. DEFINICION DE TERMINOS.

Termodegradación: Proceso de descomposición del *aceite* por medio de temperaturas mayores a 200°C.

Xenobióticos: Es todo compuesto químico que no forme parte de la composición de los organismos vivos. Suelen ser contaminantes (concentración en exceso) de determinados ambientes y generalmente ejercen algún tipo de efecto sobre los seres vivos, aunque no tengan toxicidad aguda

Mutagénico: Es un agente físico, químico o biológico que altera o cambia la información genética (usualmente ADN) de un organismo y ello incrementa la frecuencia de mutaciones por encima del nivel natural.

Aceites comestibles: Sustancia grasa de origen mineral, vegetal o animal, líquida, insoluble en agua, combustible y generalmente menos densa que el agua, que está constituida por ésteres de ácidos grasos o por hidrocarburos derivados del petróleo.

Ácidos grasos: Son un grupo de compuestos químicos caracterizados por poseer una cadena hecha de carbón e hidrógeno y que poseen un grupo de ácido carboxílico (COOH) en un extremo de la molécula. Se diferencian entre ellos por el número de átomos de carbono y el número y posición de los enlaces dobles en la cadena. Cuando no se encuentran unidos a otros compuestos se denominan ácido grasos libres.

Ácidos grasos libres: Son ácidos grasos que tienen un grupo ácido pero que no están unidos a un alcohol. Generalmente los ácidos grasos están unidos al glicerol formando triglicéridos y por lo tanto no se encuentran libres.

Carcinogénico: Un carcinógeno o cancerígeno es un agente físico, químico o biológico potencialmente capaz de producir cáncer al exponerse a tejidos vivos. Basándose en lo anterior, un carcinógeno es un agente físico o químico que puede producir una neoplasia.

Grasas: Sustancia orgánica, untuosa y generalmente sólida a temperatura ambiente, que se encuentra en el tejido adiposo y en otras partes del cuerpo de los animales, así como en los vegetales, especialmente en las semillas de ciertas plantas; está constituida por una mezcla de ácidos grasos y ésteres de glicerina.

Hidrocarburos policíclicos aromáticos(HAPs): Los HAP se forman durante la combustión incompleta del carbón, aceites, gases, madera, residuos domésticos, y en general sustancias de origen orgánico. Se encuentran de forma natural en el petróleo, el carbón, depósitos de alquitrán y como productos de la utilización de combustibles, ya sean fósiles o biomasa. Como contaminantes, tanto en el medio ambiente como en el entorno laboral, han despertado preocupación debido a que algunos compuestos han sido identificados como carcinógenos.

Oxidación: Se trata de una reacción química en la cual el enlace doble de la molécula del lípido reacciona con el oxígeno produciendo una variedad de productos químicos. Las consecuencias de esta reacción son una disminución del valor nutricional del alimento y la formación de sabores no deseables acompañados de rancidez.

Oxifrit test: Instrumento que se utiliza para la determinación semicuantitativa del estado de conservación del aceite.

Siruposo: Que tiene la consistencia viscosa , de jarabe.

CAPITULO III

METODOS Y MATERIALES

3.1. MATERIALES E INSTRUMENTOS DE LABORATORIO:

3.1.1. EQUIPOS:

- ✓ Balanza analítica Denver Instrument S-2002
- ✓ Baño de ultrasonido Branson 8510
- ✓ Baño maría ISOTEMP 205
- ✓ Campana extractora. Air Clean 600.
- ✓ Centrifuga – GreetMed GT119-100T
- ✓ Estufa. SHEL LAB SMO14-2
- ✓ HPLC Aegilent 1200
- ✓ Refrigeradora
- ✓ Rotavapor. IKA RV-10

3.1.2. MATERIALES:

- ✓ Baguetas de vidrio.
- ✓ Balón de vidrio de 100 mL.
- ✓ Bombilla de jebe.
- ✓ Embudo de vidrio de 50 mL.
- ✓ Erlenmeyer de vidrio, de 250 mL. y 500 mL.
- ✓ Filtro de membrana Econofilter, PTFE, 25mm x 0.45um
- ✓ Frascos de vidrios de color ámbar de 150 mL.
- ✓ Luna de reloj
- ✓ Pinza de tornillo.
- ✓ Pipetas automáticas.
- ✓ Pipetas pasteur
- ✓ Placas de vidrio, para cromatografía en capa fina de 20 X 20 cm.
- ✓ Probetas de vidrio, de 25 mL., 50 mL., 100 mL. y 1000 mL
- ✓ Soporte universal.
- ✓ Tubos centrifuga.
- ✓ Tubos de ensayo de vidrio de 20 cm
- ✓ Vasos de precipitados, de 50 mL., 100 mL.,y 250 mL.
- ✓ Viales Boca Ancha 12 x 32 Aegilent

3.1.3. REACTIVOS:

- ✓ Acetonitrilo
- ✓ Ácido acético glacial.
- ✓ Agua destilada.
- ✓ Benzo(a)pyrene-Estándar al 97% (HPLC)
- ✓ Etanol 99%
- ✓ Etanol al 96% .
- ✓ Eter etílico (p.a)
- ✓ Fenolftaleína 1%.
- ✓ Hexano
- ✓ Hidróxido de sodio 0.1 M
- ✓ Oxifrit-test (Merck)
- ✓ Sulfato de sodio anhidro(p.a).
- ✓ Tetracloruro de Carbono .
- ✓ Tiosulfato de sodio 0.1 M.
- ✓ Tricloruro de Yodo (p.a.)
- ✓ Yodo (p.a.)
- ✓ Yoduro de potasio.

3.2. DISEÑO METODOLÓGICO:

3.2.1. NIVEL Y TIPO DE INVESTIGACIÓN:

Cuasiexperimental: Es cuasiexperimental porque las muestras no se asignaron al azar, así mismo se manipuló una variable independiente para observar su efecto y relación con la variable dependiente.

Correlacional de corte transversal. Es correlacional porque se analizó el grado de relación que existe entre la variables independientes y la variable dependiente (presencia de 3,4 benzopireno) y de corte transversal porque se analizaron las variables, su incidencia e interrelación en un momento determinado de tiempo.

3.2.2. IDENTIFICACIÓN Y OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES:

3.2.2.1. IDENTIFICACIÓN DE VARIABLES.

VARIABLES IMPLICADAS

| Variables | | Indicador | Sub indicador | Naturaleza | Forma de medición | Escala | Instrumento/ técnica | Expresión final de la variable |
|---------------------------------|---|--|------------------------------------|--------------|-------------------|---------|-------------------------------|--|
| Variables independientes | Tiempo de reutilización de aceites y mantecas en la fritura. | Tiempo que lleva siendo usada el aceite o la manteca para fritura. | | Cualitativa | Directa | Escala | Ficha de recolección de datos | - Menor a 1 día - 1 día - 3 días - Mayor a 3 días |
| Variable dependiente | Cuantificación de 3,4 benzopireno | Concentración de 3,4 benzopireno | | Cuantitativa | Directa | Razón | HPLC | - ug/mL |
| | Grado alteración de del aceite. | Determinación de ácidos grasos oxidados | Color de viraje en la prueba | Cualitativa | Directa | Nominal | Kit Oxifrit-test (Merck) | - Azul: Sin alteración - Verde-azulado: Poco alterado - Verde: Muy alterado - Verde-oliva: Totalmente alterado |
| | | Establecimiento | Lugar donde se realiza la fritura. | Cualitativa | Directa | Nominal | Ficha de recolección de datos | - Chicharronerías - Pollerías |
| | | Características Físico-químicas | Índice de acidez | Cuantitativa | Directa | Razón | Titulación | -% |
| | | | Índice de Yodo | Cuantitativa | Directa | Razón | Titulación | -gr de yodo /100 de masa |
| | | Características organolépticas | Color | Cualitativa | Directa | Nominal | Ficha de recolección de datos | - Amarillo: Sin alteración - Amarillo ambar: Poco alterado - Pardo rojizo: Alterado - Pardo: Muy alterado - Negrusco: Totalmente alterado |
| | | | Olor | Cualitativa | Directa | Nominal | Ficha de recolección de datos | - Característico: Sin alteración. - Rancio: Alterado |
| | | | Consistencia | Cualitativa | Directa | Nominal | Ficha de recolección de datos | - Líquido oleoso : Sin alteración - Siruposa: Alterado |

VARIABLES NO IMPLICADAS:

- Zona del establecimiento.
- Tipo de producto frito.

3.2.2.2. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

VARIABLE INDEPENDIENTE

A) Tiempo de reutilización de aceites y mantecas en la fritura.

Definición conceptual:

Tiempo en el cuál se somete al aceite o manteca a altas temperaturas y son reutilizados. En él se produce una serie de reacciones químicas que hacen que éste pierda alguna de sus cualidades, por ejemplo aporte de vitaminas, cambios en el olor, sabor y textura, producción de sustancias dañinas para la salud como son los radicales libres , hidrocarburos aromáticos, entre otros.

Definición operacional:

- Naturaleza: Cualitativa
- Escala de medición: Nominal
- Forma de medición: Directa
- Indicadores: Días de uso de los aceites
- Expresión final:
 - Menor a 1 día
 - 1día-3 días
 - Mayor a 3 días
- Procedimiento:

Se determinó el tiempo de uso de las mantecas mediante la ficha de recolección de datos.

VARIABLE DEPENDIENTE:

A) Cuantificación de 3,4 benzopireno

Definición conceptual: La cuantificación de benzopireno en muestras de aceites y mantecas es compleja debido a los bajos niveles de concentración y los múltiples compuestos interferentes, por tal motivo es necesario seguir previamente un proceso de extracción, la más empleada es la extracción líquido-líquido; para luego cuantificarla mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) con detector DAD, utilizando la técnica de adición de estándar.

Definición operacional:

- Naturaleza: Cuantitativa
- Escala de medición: Razón
- Forma de medición: Directa
- Indicadores:
 - o Absorbancia en el detector DAD.
- Expresión final:
 - o ug/mL
- Operacionalización:
 - o Se procederá a la cuantificación mediante la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), utilizando las muestras y un estándar secundario para realizar la comparación.

B) Grado de alteración de los aceites

a) INDICADOR : Determinación de ácidos grasos oxidados

Definición conceptual: Los ácidos grasos en presencia del oxígeno ambiental dan lugar a compuestos intermedios inestables denominados hidroperóxidos que a su vez dan lugar a la formación de radicales libres. Este proceso se ve catalizado por la incidencia de la luz. Los ácidos grasos más insaturados son más lábiles a la oxidación. Para su

determinación existen una gran variedad de test químicos, uno de los más usados es el Oxifrit-test , que es una prueba colorimétrica.

Definición operacional:

- Naturaleza: Cualitativa
- Escala de medición: Nominal
- Forma de medición: Directa
- Indicadores:
 - o Color de viraje en la prueba.
- Expresión final:
 - o Azul: sin alteración.
 - o Verde-azulado: poco alterado.
 - o Verde: muy alterado.
 - o Verde-oliva: totalmente alterado.
- Procedimiento:
 - o Se midió de acuerdo a la prueba colorimétrica Oxifrit-test usado para la determinación de ácidos grasos.

b) INDICADOR: Características físico-químicas

1)Subindicador: Índice de acidez.

Definición conceptual: Es el porcentaje de los ácidos libres contenidos en el aceite. En los aceites vegetales se expresa como si todos los ácidos libres fueran ácido oleico.

Definición operacional:

- Naturaleza: Cuantitativa
- Escala de medición: De razón
- Forma de medición: Directa
- Indicadores:
 - o Viraje de color.
- Expresión final:

- o % de ácidos grasos libres en la muestra
- Procedimiento:
 - o Se tituló la muestra usando como indicador una solución de fenolftaleína 1%

2) Subindicador : Índice de Yodo

Definición conceptual: Se define como: Gramos de Yodo que reaccionan con 100 gramos de sustancia. El Índice de Yodo es una escala utilizada para definir un grado de insaturación de un compuesto orgánico que contiene enlaces diénicos o triénicos.

Definición operacional:

- Naturaleza: Cuantitativa
- Escala de medición: De razón
- Forma de medición: Directa
- Indicadores:
 - o Viraje de color.
- Expresión final:
 - o % de ácidos grasos libres en la muestra
- Procedimiento:
 - o Se tituló la muestra usando como indicador una solución de almidón al 1%.

c) INDICADOR: Características organolépticas

Definición conceptual: Las características o propiedades organolépticas de un cuerpo son todas aquellas que pueden percibirse de forma directa por los sentidos (todos ellos, no sólo la vista), sin utilizar aparatos o instrumentos de estudio.

Definición operacional:

1) Subindicador: Color

Definición conceptual: Impresión que los rayos de luz reflejados por un cuerpo producen en la retina del ojo.

Definición operacional:

- Naturaleza: Cualitativa
- Escala de medición: Nominal
- Forma de medición: Directa
- Indicadores:
 - o Color de la muestra recolectada.
- Expresión final:
 - o Amarillo
 - o Amarillo ambar
 - o Pardo rojizo
 - o Pardo
 - o Negruzco
- Procedimiento:
 - o Se evaluó visualmente, el color de la muestra, según la clasificación de los colores de las muestras que se detallan en la ficha de recolección.

2) Subindicador: Olor

Definición conceptual: Impresión que producen en el olfato las emanaciones que despiden las sustancias.

Definición operacional:

- Naturaleza: Cualitativa
- Escala de medición: Nominal
- Forma de medición: Directa
- Indicadores:
 - o Olor de la muestra recolectada.

- Expresión final:
 - o Característico
 - o Rancio
- Procedimiento:
 - o Se evaluó el olor de la muestra, según la clasificación de los olores de las muestras, basado en dos aspectos: lo característico y lo rancio.

3) Subindicador: Consistencia

Definición conceptual: Cohesión entre las partículas de un cuerpo.

Definición operacional:

- Naturaleza: Cualitativa
- Escala de medición: Nominal
- Forma de medición: Directa
- Indicadores:
 - o Consistencia de la muestra recolectada.
- Expresión final:
 - o Líquido oleoso
 - o Siruposa
 - o Sólida
 - o Oleosa sólida
- Procedimiento:
 - o Se evaluó visualmente, la consistencia de la muestra, según se detalla en la ficha de recolección..

d) INDICADOR: Establecimiento

1) Subindicador : Lugar donde se realiza la fritura

Definición conceptual: Establecimiento o puesto en el que se venden comidas de diferentes tipos, ya sean aves comestibles, carnes , etc.

Definición operacional:

Naturaleza: Cualitativa

- Escala de medición: Nominal

- Forma de medición: Directa

- Expresión final:

- Chicharronerías.

- Pollerías

- Procedimiento:

Se determinó el tiempo de uso de las mantecas mediante la ficha de recolección de datos.

3.2.3. POBLACIÓN Y MUESTRA

3.2.3.1. POBLACIÓN:

- Aceites y grasas usadas en el proceso de fritura provenientes de chicharronerías y pollerías del centro Histórico del Cusco.

3.2.3.2. TAMAÑO DE MUESTRA

El método de selección de la muestra fue por muestreo no probabilístico, de tipo intencional debido a que se tomó en cuenta a establecimientos ubicados en las principales calles del centro Histórico del Distrito de Cusco (Calle San Andrés, Pampa del Castillo, Calle Tres Cruces de Oro, Plaza San Francisco, Calle Belén) donde existe mayor demanda de chicharrones y pollos a la brasa.

El número total de Chicharronerías y Pollerías que se evaluaron fue de 20 establecimientos 14 chicharronerías y 6 pollerías.

3.2.4. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

3.2.4.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

- o Aceites o mantecas que presenten grado de alteración según la prueba de oxifrit-test en establecimientos que se dediquen a la preparación de chicharrones o pollos a la brasa con licencia registrada en la Municipalidad del Cusco.

3.2.4.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

- Establecimientos de comida que no se dediquen exclusivamente a la preparación de chicharrones o pollos a la brasa.
- Establecimientos que no tengan licencia de funcionamiento de la Municipalidad Distrital del Cusco.
- Aceites o grasas de establecimientos, donde los aceites y mantecas sean de menos de 3 horas de uso.
- Puestos ambulantes de comida.

3.2.5. INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS.

La técnica de recolección usada fue la encuesta, la cual consiste en una serie de preguntas con opciones múltiples, referentes a una temática determinada que permite recopilar información sobre el grado de conocimiento de los temas tratados en la presente investigación.

El instrumento que se utilizó consiste en una ficha de recolección de datos la cual el investigador llenó o marcó según corresponda con la información general del establecimiento de donde procede el aceite y las características organolépticas y aspectos físico-químicos de la muestra.

Cada ficha tiene un número y un espacio para las observaciones en las que el investigador deberá anotar con claridad lo acontecido con la muestra.

También se realizó la técnica de observación laboratorial, donde se determinó el grado de alteración de las muestras mediante pruebas de viraje de color y pruebas de titulación.

Se diseñaron para la documentación correspondiente:

- Ficha de datos para la recolección de muestras (Anexo 2)
- Hoja de resultados de determinación de benzopireno. (Anexo 3)

3.2.6. TÉCNICAS PARA PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN.

Se usó el software estadístico SPSS (Statistical Package for Social Sciences), y Stats Graphics Centurion XV ,para procesar los datos y realizar el análisis de información.

- Se usó la prueba de chi cuadrado, prueba que permite determinar si dos variables son independientes o están asociadas.
- Se usó la prueba de Tukey, para determinar la homogeneidad entre grupos de variables.

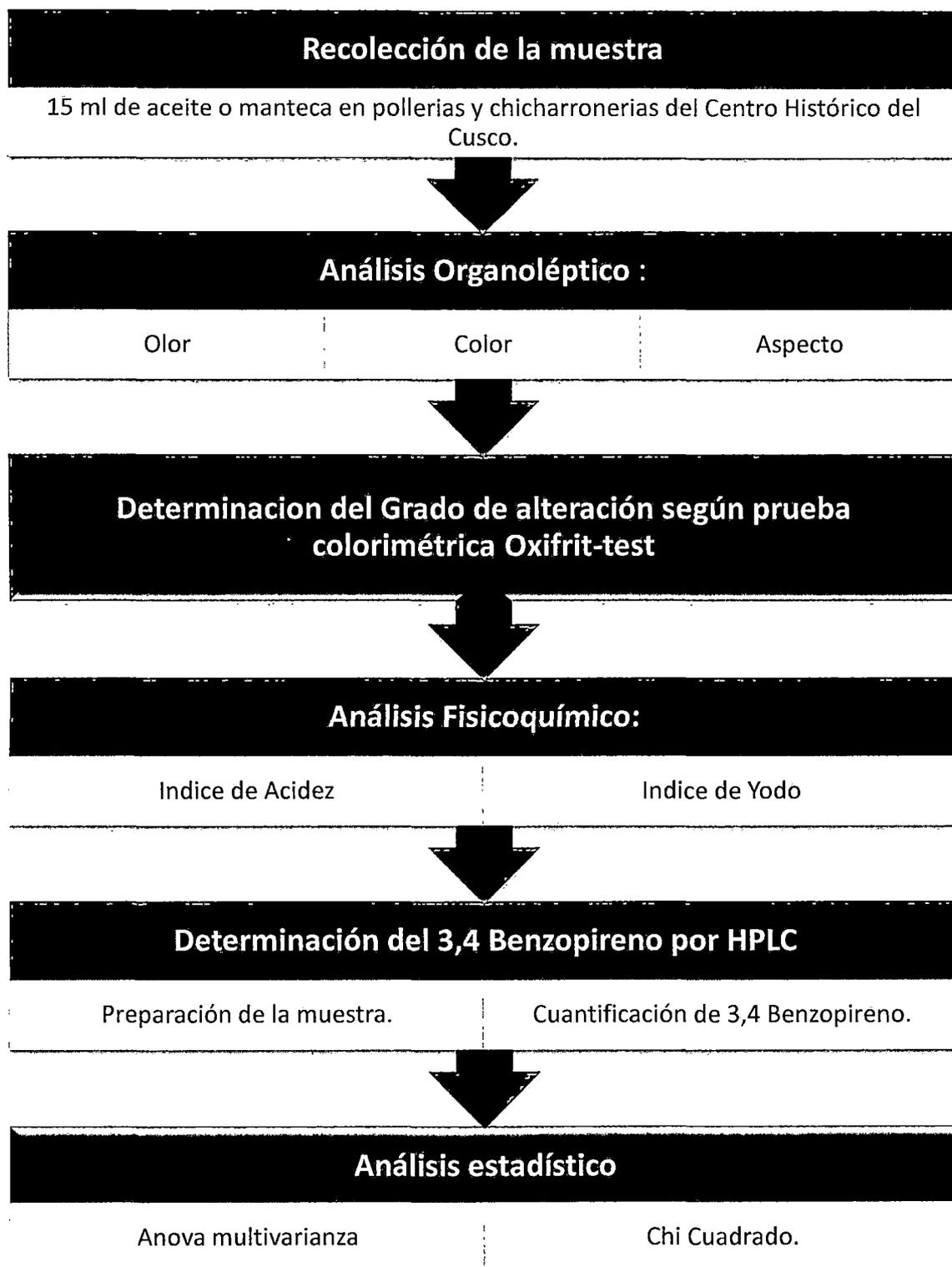
➤ PROCEDIMIENTO GENERAL

Se recolectaron 20 muestras de manteca y aceite de las diferentes chicharronerías y pollerías del Centro Histórico del Cusco, mediante inspección con la responsable del Área de Sanidad Ambiental Químico Lourdes Galiano de la Municipalidad Provincial del Cusco, se recolectaron 8 muestras por día en frascos herméticos color ámbar, aproximadamente 50 mL por frasco. Cada toma de muestra duró un tiempo de 45 minutos aproximadamente, así mismo se realizó una encuesta a cada propietario de cada establecimiento. El análisis organoléptico y la prueba colorimétrica con el Oxifrit-test se realizaron en el mismo instante de la toma de muestra, ya que el método refiere que se trabaje con muestra caliente. Se tomaron las medidas de seguridad e higiene en al realizar dichas pruebas, sobre todo al manipular el equipo del Oxifrit-test.

Para la determinación de 3,4 benzopireno, las muestras se almacenaron a temperatura de 2°C para su adecuada conservación. Se trabajaron 6 muestras por día, mediante extracción líquido-líquido, utilizando como solvente hexano, de la misma forma se realizó saponificación en cada muestra con NaOH para eliminar interferentes (ácidos grasos). Para proceder a realizar las lecturas en HPLC primero se realizó el análisis del estándar de benzopireno, siendo este el patrón de comparación para las demás muestras. Se realizó una triple corrida por muestra utilizando la técnica de adición por estándar en HPLC – DAD en el laboratorio de cromatografía de la Universidad Nacional de San Antonio Abad. Cada corrida tardó 10 minutos, haciendo un total de media hora por muestra.

Los análisis físico-químicos (Índice de Yodo e índice de acidez), se realizaron posteriormente en el laboratorio de Química Orgánica, siguiendo los métodos oficiales de la AOAC.

3.3. PROCEDIMIENTO GENERAL



Fuente: Elaboración propia.

3.3.1. RECOLECCIÓN DE MUESTRA:

- Las muestras están constituidas por aceites y grasas comestibles alteradas por recalentamiento provenientes de los diferentes establecimientos de venta de alimentos fritos.
- Con apoyo de la Gerencia de Medio Ambiente de la Municipalidad del Cusco se realizaron visitas inopinadas a las zonas de mayor comercialización de chicharrones y pollos a la brasa, lo que permitió evaluar también las condiciones de manipulación y limpieza con la mayor fidelidad posible.
- En los establecimientos seleccionados se recolectó la muestra de grasa. Para este fin se utilizaron frascos de vidrio de color ámbar, boca ancha, seco con tapa hermética, y de capacidad de 150 mL; estas características del envase son importantes para evitar la degradación del 3,4-benzopireno que es sensible a la luz solar y a su vez impedir la oxidación con el aire del ambiente.
- Las muestras fueron previamente coladas para separar las partículas extrañas que pudiera contener. Adicionalmente para la conservación de las muestras durante el tiempo del análisis se almacenó en un ambiente frío.

3.3.2. ANALISIS ORGANOLEPTICO:

Olor:

- a) Se adicionó 20 mL de la muestra en una probeta de 100mL de capacidad.
- b) Se evaluó el olor de la muestra, según la clasificación de los olores de las muestras, basado en dos aspectos: lo característico y lo rancio.

Color:

- a) Se adicionó 20 mL de la muestra en una probeta de 100mL. de capacidad.
- b) Se ubicó la probeta sobre un fondo blanco.

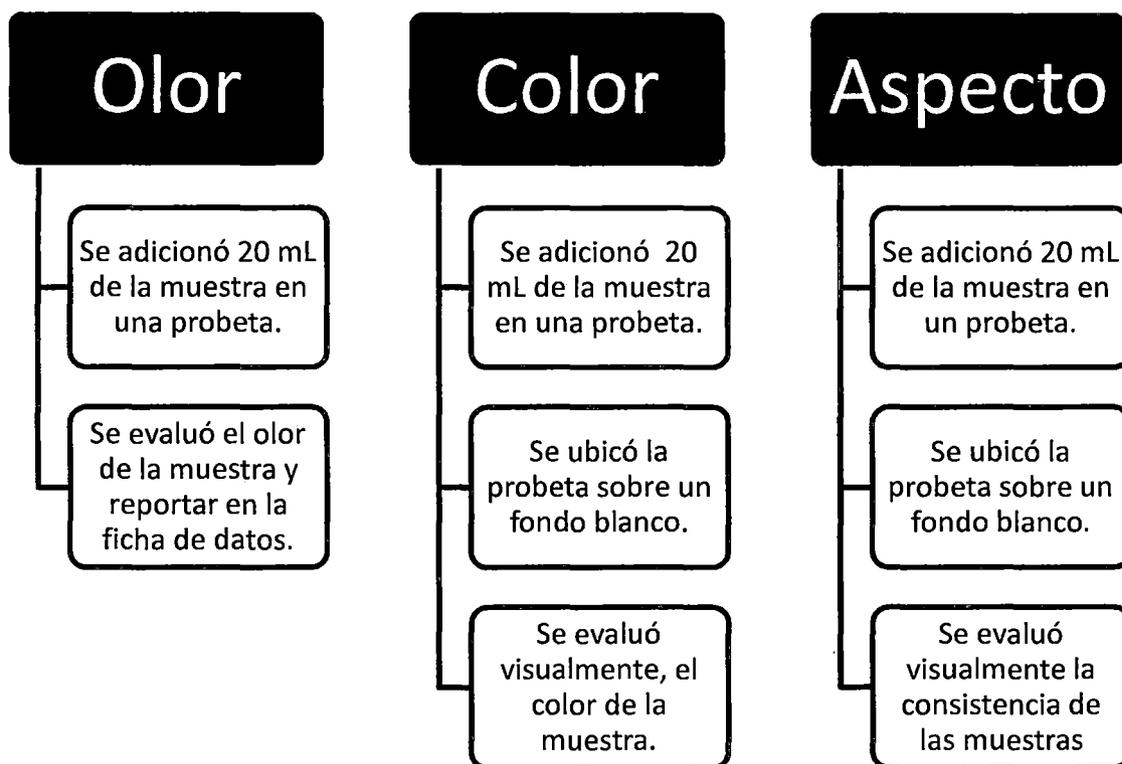
c) Se evaluó visualmente, el color de la muestra, según la clasificación de los colores de las muestras que se detallan en amarillo, amarillo – ámbar, pardo oscuro, pardo rojizo, pardo rojizo oscuro y pardo negruzco.

Aspecto:

- a) Adicionamos 20 mL de la muestra en un probeta de 100 mL.
- b) Se ubicó la probeta sobre un fondo blanco.
- c) Se evaluó visualmente la consistencia de las muestras, según la clasificación de las consistencias de estas como:

- Líquida – oleosa (aceite).
- Siruposa (aceite).
- Sólida (manteca).
- Oleosa sólida (aceite – manteca)

Flujograma 1 : Procedimiento de análisis organoléptico



Fuente: Elaboración propia.

3.3.3. ANALISIS FISICO-QUIMICO

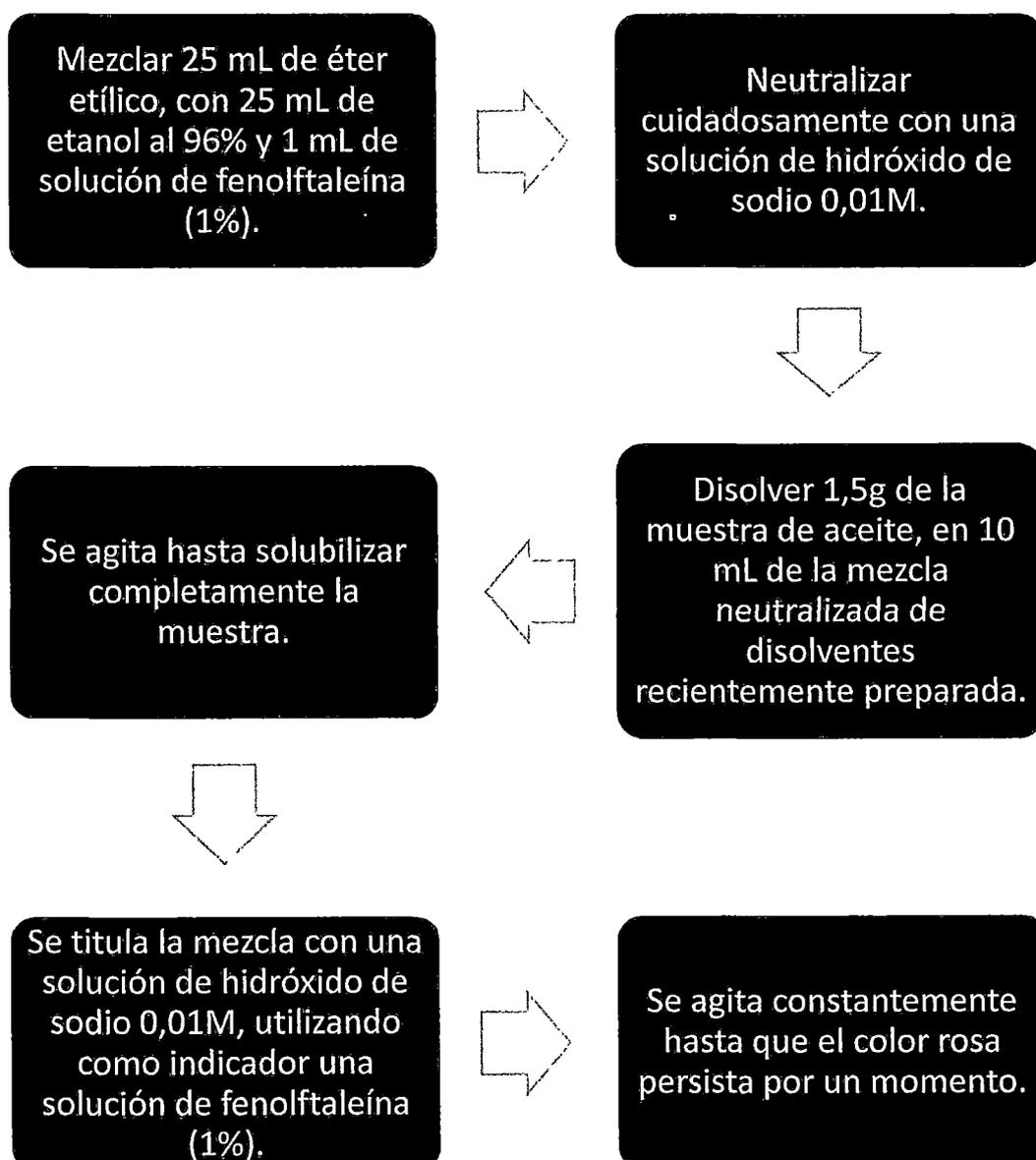
Determinación del Índice de Acidez (Método oficial de la A.O.C.S - Asociación de Químicos Analíticos Oficiales)

- Se mezcló 25 mL de éter etílico, con 25 mL de etanol al 96% y 1 mL de solución de fenolftaleína (1%).
- Se neutralizó cuidadosamente con una solución de hidróxido de sodio 0,01M.
- Se disolvió 1,5g de la muestra de aceite, en 10 mL de la mezcla neutralizada de disolventes recientemente preparada. Se agitó hasta solubilizar completamente la muestra.
- Se tituló la mezcla con una solución de hidróxido de sodio 0,01M, utilizando como indicador una solución de fenolftaleína (1%). Se agitó constantemente hasta que el color rosa persista por un momento (aproximadamente 30 segundos).
- Cálculos:

$$\% \text{ Índice de acidez} = \frac{V (\text{NaOH}) \times N(\text{NaOH}) \times PM}{\text{Peso de la muestra}}$$

- Donde:
 - N = Normalidad de Hidróxido de sodio.
 - V = Numero de mililitros gastados de Hidróxido de sodio para la titulación.
 - PM = Peso molecular del ácido oleico.

**Flujograma 2: Procedimiento para la determinación del Índice de acidez.
(A.O.C.S)**



Fuente: Elaboración propia

Determinación del Índice de Yodo (método de Wijs)

• **Preparación del reactivo de Wijs:**

- Se disolvió 8g de tricloruro de yodo en 200 mL de ácido acético glacial y 9 g de yodo en 300 mL de tetracloruro de carbono y

luego se mezcla las dos soluciones y se diluyó a 1000 mL con ácido acético glacial.

- Vertimos de 0,2 a 0,3g de la muestra de aceite, en un matraz esmerilado (de aproximadamente 250 mL de capacidad).
- Se adicionó 10 mL de tetracloruro de carbono, al matraz esmerilado y se agitó para disolver la muestra.
Se adicionó 20 mL del reactivo de Wijs, y cerrar bien el matraz. Se dejó reposar la mezcla en la oscuridad durante 30 minutos.
- Luego, se adicionó al matraz 15 mL de una solución de yoduro de potasio al 10% y 100 mL de agua destilada. Se agitó bien la mezcla.
- Se tituló la mezcla con una solución 0,1M de tiosulfato de sodio, usando una solución de almidón al 1% como indicador.
- Se realizó una prueba en blanco, consecutivamente con la evaluación de la muestra problema.
- Cálculos:

$$I = \frac{(V1 - V2) \times N \times 0,1269}{P}$$

P

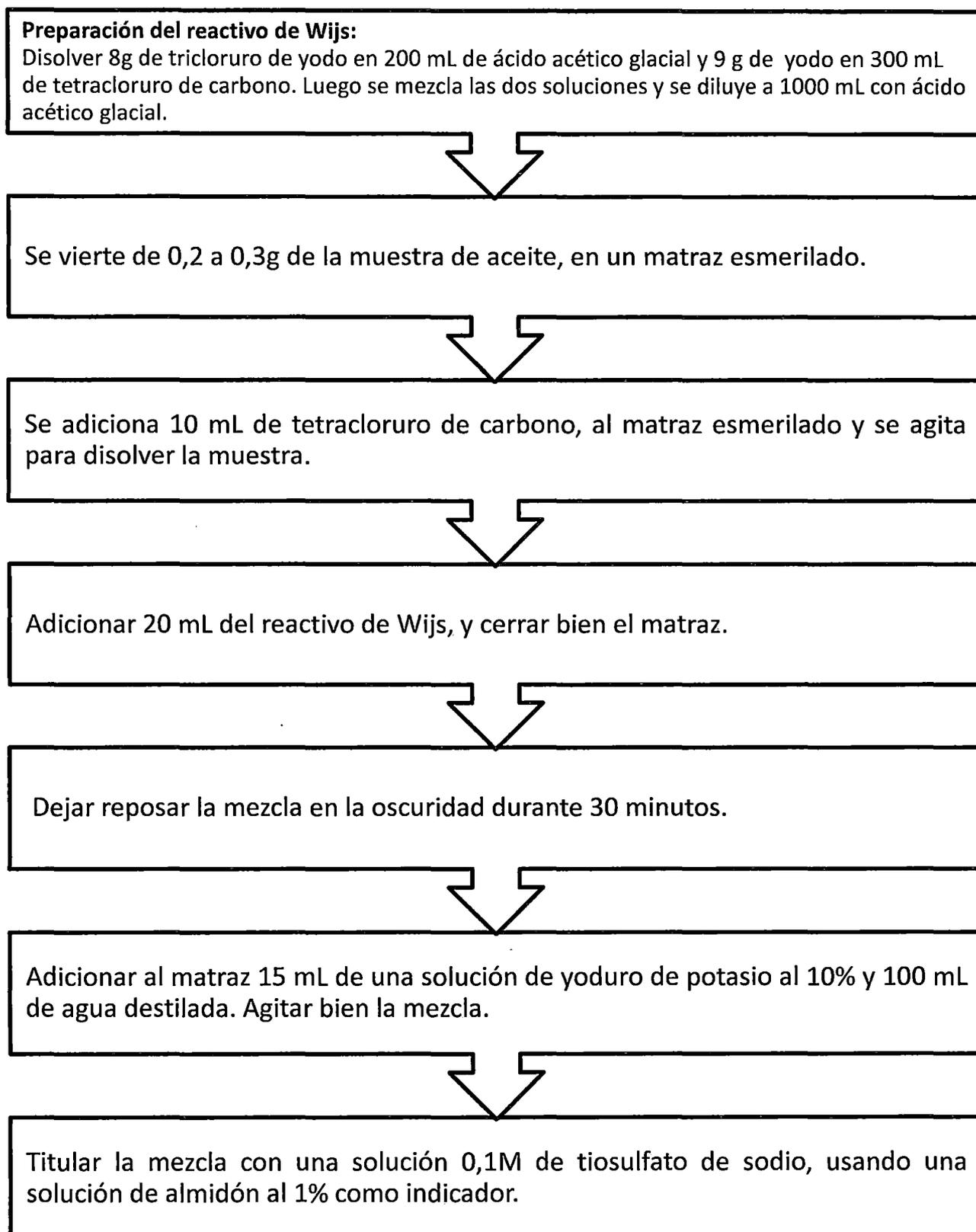
- Dónde:
 - I: índice de yodo.
 - V1: volumen de tiosulfato de sodio gastados en el blanco, en mL.
 - V2: volumen de tiosulfato de sodio gastados en la muestra, en mL.
 - N: normalidad de la solución de tiosulfato de sodio.
 - P: peso de la muestra, en gramos.
 - 0,1269: peso de un miliequivalente de yodo, en gramos.

3.3.4. DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS OXIDADOS :

Se usó una prueba de determinación rápida, Oxifrit-test de laboratorios Merck que es una prueba colorimétrica de determinación de ácidos grasos oxidados basándose en el ensayo de Perevalov en el cual se usa un indicador redox que cambia de color al aumentar la cantidad de compuestos de oxidación.

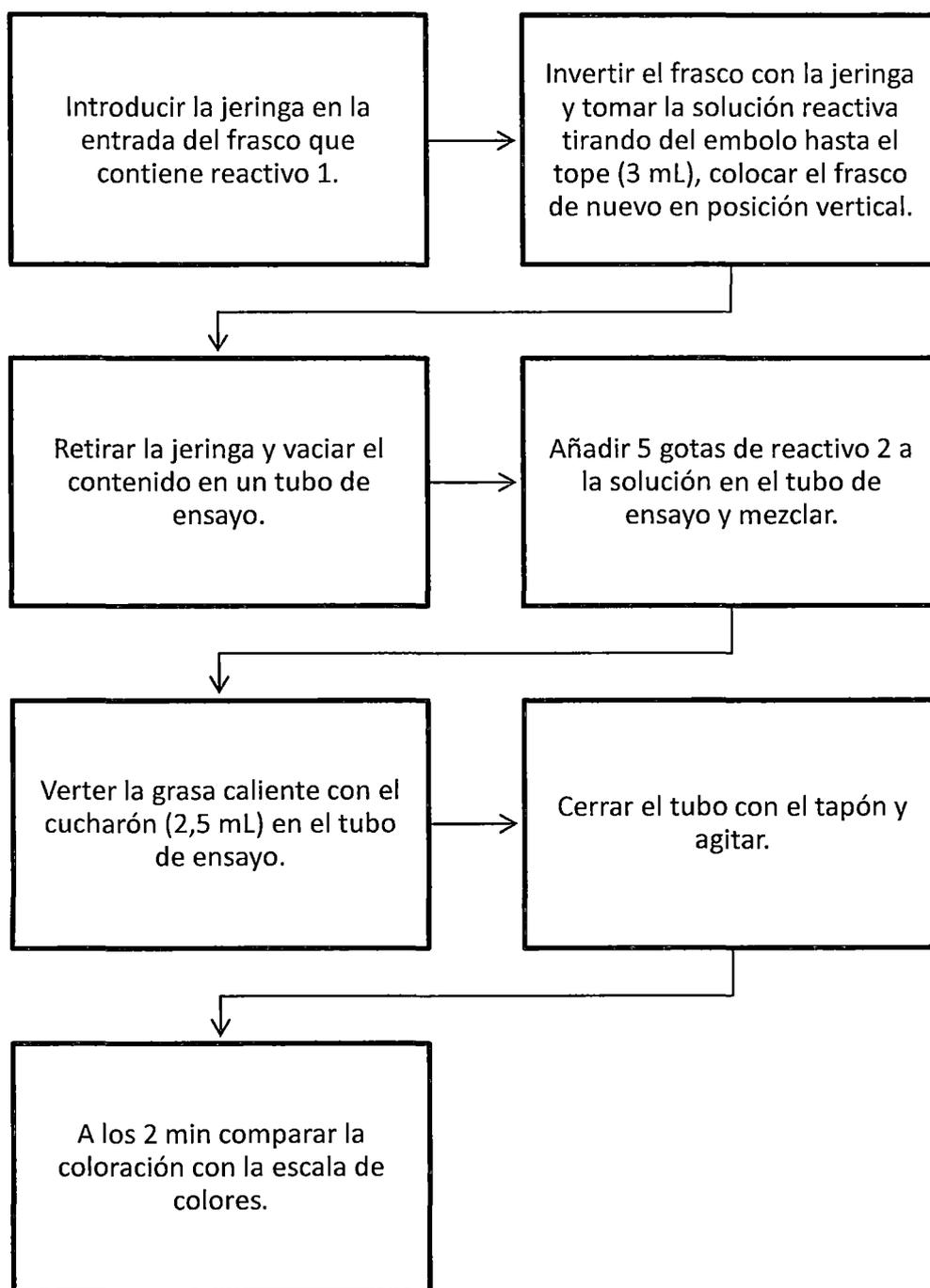
- **Procedimiento:** Se realizó según el manual de instrucciones del propio *kit* consistente en:
 - 1) Introducir la jeringa en la entrada del frasco que contiene reactivo 1.
 - 2) Invertir el frasco con la jeringa y tomar la solución reactiva tirando del embolo hasta el tope (3 mL), colocar el frasco de nuevo en posición vertical.
 - 3) Retirar la jeringa y vaciar el contenido en un tubo de ensayo.
 - 4) Añadir 5 gotas de reactivo 2 a la solución en el tubo de ensayo y mezclar.
 - 5) Verter la grasa caliente con el cucharón (2,5 mL) en el tubo de ensayo.
 - 6) Cerrar el tubo con el tapón y agitar.
 - 7) A los 2 min comparar la coloración con la escala de colores que es la siguiente:
 - a. Azul: sin alteración.
 - b. Verde-azulado: poco alterado.
 - c. Verde: muy alterado.
 - d. Verde-oliva: totalmente alterado.

Flujograma 3: Procedimiento para la determinación del Índice de Yodo (A.O.C.S)



Fuente: Elaboración propia

Flujograma 4 : PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACION DEL GRADO DE ALTERACION DEL ACEITE MEDIANTE TECNICA DE OXIFRIT-TEST



Fuente: Elaboración propia

3.3.5. DETERMINACIÓN DEL 3,4 – BENZOPIRENO

a) Optimización del método de extracción de 3,4 benzopireno en aceites y mantecas

Cuadro N° 9 Condiciones para la extracción líquido-líquido en diferentes pruebas.

| Condiciones para extracción | | | | | |
|-----------------------------|-------------------------|---------------------------------|--------------------|-----------------------|-----------------------|
| | Prueba 1 | Prueba 2 | Prueba 3 | Prueba 4 | Prueba final |
| Peso de la muestra. | 2.5 gr | 1 gr | 1 gr | 1 gr | 1 gr |
| Solvente. | 15 mL de Hexano (x 3) | 5 mL Hexano – DCM (70:30) (x 3) | 5 mL DMS (x 3) | Hexano 5 ml (x 3) | 5 mL de Hexano (x 3) |
| Saponificante | 7,5 mL NaOH: EtOH (2 M) | 5 mL NaOH: EtOH (1 M) | 5 mL NaOH 1M (x 3) | 3.25 mL NaOH 1M (x 3) | 3.25 mL NaOH 1M (x 3) |
| T° de saponificación | 50 ° C | 40° C | 60° C | 60 ° C | 60° c |
| T° de rotavapor | 40° C | 40° C | 60 ° C | 40° C | 40 ° C |
| Velocidad de rotavapor | 20 rpm | 20 rpm | 40 rpm | 40 rpm | 20 rpm |
| Fase Móvil | MeCN | MeCN | DMF- Agua (1:2) | MeCN- Agua (1:1) | MeCN |
| Aparición de BaP en HPLC | NO | NO | Trazas | Trazas | SI |

Fuente: Elaboración propia.

Dónde:

- NaOH: Hidroxido de Sodio
- DCM : Diclorometano
- EtOH: Etanol
- MeCN : Acetonitrilo
- DMF : Dimetilformamida
- DMS: Dimetilsulfóxido

En el cuadro N° 9 podemos observar las diferentes condiciones con las que se realizaron las pruebas preliminares de la extracción líquido – líquido para su posterior optimización. A continuación se describe la elección de las condiciones para la extracción.

Peso de Muestra:

Para comenzar la extracción de la muestra se tomó en un principio 2,5 gr de muestra, esta cantidad de muestra dificultó el proceso de saponificación tanto en tiempo, como en cantidad de muestra saponificada.

Solvente de extracción:

Para realizar la extracción líquido-líquido se usó en pruebas: 15 mL de Hexano, 5 mL Hexano – Diclorometano (70:30), 5 mL Isooctano y 5 ml Dimetilsulfoxido, se eligió el Hexano siendo este el solvente con mayor capacidad de extracción de HAPs como se demuestra en la cantidad leída por el HPLC.

Concentración de NaOH requerido para la saponificación.

Para realizar la saponificación directa de la muestra se utilizó NaOH – EtOH (2 M), NaOH: EtOH (1 M), NaOH 1M. Se descartó el NaOH: EtOH debido a que no favorece la saponificación, eligiendo el NaOH 1M con el que se formaba claramente una fase jabonosa.

Temperatura de saponificación

Para determinar la temperatura de calentamiento requerida para que ocurra una mejor saponificación en las muestras de aceites y mantecas se evaluaron 3 temperaturas: 40 °C, 50°C y 60 °C, siendo la temperatura de 60 °C donde se observó una saponificación completa de las muestras.

Temperatura y velocidad de rotavapor.

Se usó dos diferentes temperaturas 40 y 60 °C a dos diferentes velocidades 20 y 40 rpm, se eligió la temperatura a 40 °C con 20 rpm debido a que estas son las mejores condiciones para extraer el solvente usado (hexano).

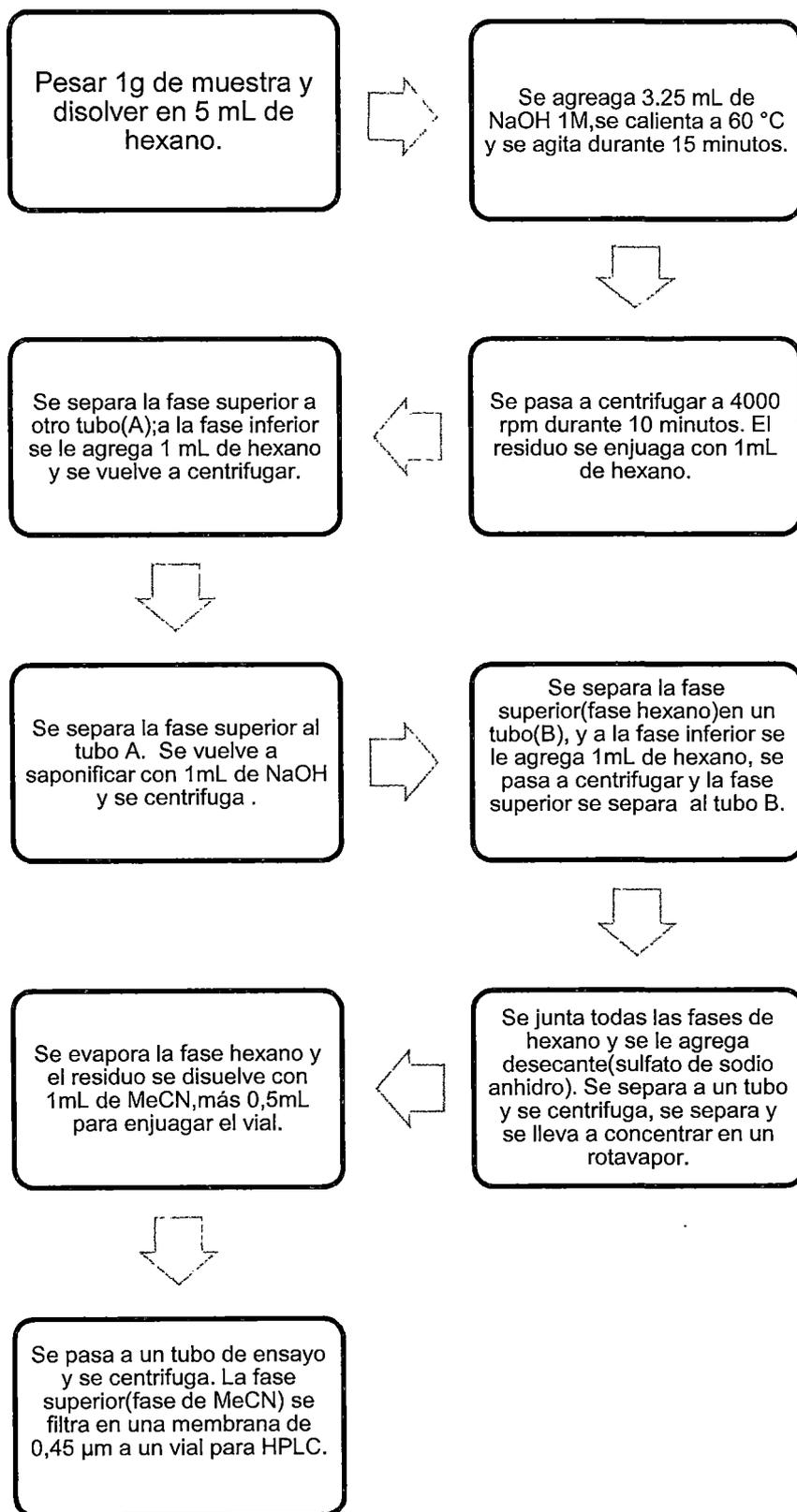
Fase móvil

Para determinar la fase móvil idónea se probó: MeCN, DMF - Agua (1:2) y MeCN- Agua (1:1), obteniendo mejores resultados en la lectura del HPLC las pruebas realizadas con Acetonitrilo (MeCN).

b) Preparación de la muestra

- Se pesó 1g de muestra y se disolvió en 5 mL de hexano.
- Se agregó 3.25 mL de NaOH 1M, se calentó a 60 °C y se agitó durante 15 minutos.
- Se pasó a centrifugar a 4000 rpm durante 10 minutos. El residuo se enjuagó con 1mL de hexano.
- Se separó la fase superior a otro tubo(A); a la fase inferior se le agregó 1 mL de hexano y volvimos a centrifugar.
- Se separó la fase superior al tubo A. Se volvió a saponificar con 1mL de NaOH y se centrifugó .
- Se separó la fase superior (fase hexano) en un tubo (B), y a la fase inferior se le agrega 1mL de hexano, se pasa a centrifugar y la fase superior se separa al tubo B.
- Se juntó todas las fases de hexano y se le agregó desecante (sulfato de sodio anhidro). Se separó a un tubo y se centrifugó, se separó y se llevó a concentrar en un rotavapor.
- Se evaporó la fase hexano y el residuo se disuelve con 1mL de MeCN, más 0,5mL para enjuagar el vial.
- Se pasó a un tubo de ensayo y se centrifuga. La fase superior (fase de MeCN) se filtra en una membrana de 0,45 µm a un vial para HPLC.

FLUJOGRAMA 5: PREPARACION DE MUESTRAS PARA LA DETERMINACION DE 3,4 BENZOPIRENO EN HPLC



Fuente: Elaboración propia

c) Cuantificación de 3,4 Benzopireno por HPLC.

Preparación del Estándar:

Pesar 1 mg de estándar de Benzopireno en una fiola de 10 mL , disolver y enrasar con Acetonitrilo. Tomar 100 ul de la dilución anterior en un vial de 1000 ul y enrasar con acetonitrilo.

Cuantificación por adición de Estándar:

Para la cuantificación de 3,4 Benzopireno por HPLC se usó el método de "Cuantificación por adición de estándar". Dicho método se usa para análisis de trazas. Diferentes cantidades del analito que se desea medir se adicionan a la solución problema, la cual contiene una concentración desconocida de analito. A la cuantificación total se le resta el valor de la cantidad adicionada; de esta manera se puede calcular la concentración desconocida. Este procedimiento se repite tres veces por cada muestra.

Este método es utilizado para la determinación de PAHs, por las bajas concentraciones en que se hallan, como lo indica la investigación "A novel baseline-correction method for standard addition based derivative spectra and its application to quantitative analysis of benzo(a)pyrene in vegetable oil samples" China 2011, donde emplean un método de corrección de línea de base que se aplicó a la determinación de benzopireno en muestras de aceite vegetal por espectroscopia de fluorescencia. Los resultados satisfactorios se obtuvieron mediante el uso de adición de estandar, para analizar un material de referencia certificado (aceite de coco) con un error relativo de 3,2% a partir de la concentración de B(a)P certificado. Potencialmente, el método propuesto se puede aplicar a varios tipos de espectros derivado en diferentes campos como la espectroscopía de absorción UV-visible, espectroscopia de fluorescencia y espectroscopia infrarroja.

En nuestro trabajo, las muestras se analizaron por HPLC, ya que el estándar de benzopireno no presentaba una lectura favorable por espectrometría de gases.

- **CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS**

- Equipo: HPLC Agilent 1200
- Columna Cromatográfica : Eclipse XDB-C18 4.6 x 250mm, 5um
- Fase Móvil : ACN (100)
- Flujo de FM :0.9 mL/ minuto
- Longitud de Onda : 254 nm
- Detector : DAD
- Volumen de Inyección: 30 uL
- Temperatura: 40°C

- **FÓRMULA PARA CUANTIFICAR NIVELES DE BAP POR ADICIÓN DE ESTÁNDAR:**

$$BaP \left(\frac{ug}{mL} \right) = \frac{(A_m - A_s) \times 100 \text{ ug/mL}}{A_s}$$

Donde:

A_m = Área de la Muestra + estándar

A_s = Área del estándar

100 ug/mL = Concentración de estándar de BaP.

**CAPITULO IV
RESULTADOS**

TABLA N° 1. ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA CONCENTRACIÓN DE 3,4 BENZOPIRENO POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC) EN ACEITES Y MANTECAS COMESTIBLES SEGÚN EL TIEMPO DE USO EN CHICHARRONERÍAS Y POLLERÍAS DEL CENTRO HISTÓRICO DEL CUSCO.

| Fuente | Media de Concentración de BaP (ug/mL) | | | Media de Concentración de BaP (ug/mL) | | Cuadrado Medio | Razón-F | P valor |
|-----------------------------|---------------------------------------|------------|----------------|---------------------------------------|----------|----------------|---------|---------|
| | Menor a 1 día | (1 -3 día) | Mayor a 3 días | Chicharronería | Pollería | | | |
| EFFECTOS PRINCIPALES | | | | | | | | |
| A:Tiempo de Uso | 8.39735 | 10.4545 | 15.9669 | - | - | 87.2811 | 6.07 | 0.0126 |
| B: Establecimiento | - | - | - | 12.699 | 10.5135 | 19.9943 | 1.39 | 0.0278 |
| INTERACCIONES | | | | | | | | |
| AB | - | - | - | - | - | 17.0592 | 1.19 | 0.0340 |

Fuente: Datos experimentales

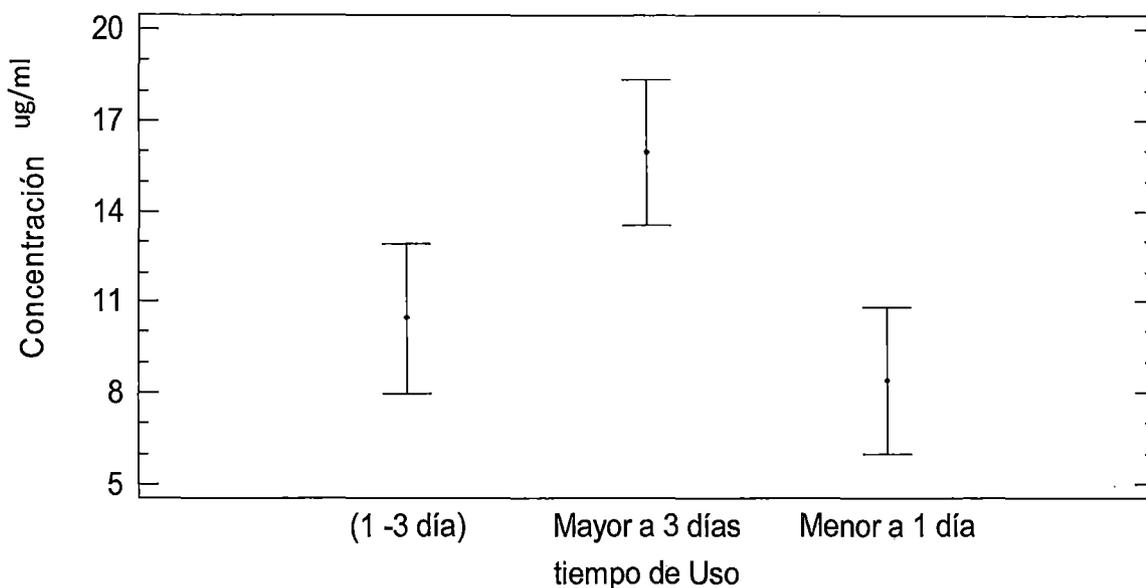
TIEMPO DE USO:

De la tabla N° 1 se plantea las siguientes hipótesis estadísticas

- Ho: El tiempo de uso no influye en la concentración.
- Hi: El tiempo de uso si influye en la concentración.

Del análisis de varianza bifactorial, se acepta Hi (P valor = 0.0126 < 0.05), es decir el tiempo de uso si influye en la concentración.

GRAFICO N° 1: CONCENTRACIÓN DE BENZOPIRENO DE ACUERDO AL TIEMPO DE USO DE LAS MUESTRAS EN CHICHARRONERÍAS Y POLLERÍAS DEL CENTRO HISTÓRICO DE CUSCO.



Fuente: Datos experimentales

| <i>Nivel</i> | <i>Media</i> (ug/mL) | <i>Límite Inferior</i> (ug/mL) | <i>Límite Superior</i> (ug/mL) |
|-----------------------|-------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| Tiempo de uso | | | |
| Menor a 1 día | 8.39735 | 4.99638 | 11.7983 |
| (1 -3 día) | 10.4545 | 6.93416 | 13.9748 |
| Mayor a 3 días | 15.9669 | 12.5659 | 19.3679 |

Fuente: Datos experimentales

-Para determinar qué tiempo de uso presenta mayor concentración se utiliza la prueba de Tukey.

TABLA N° 2: PRUEBA DE TUKEY – TIEMPO DE USO

| <i>Tiempo de Uso</i> | <i>Casos</i> | <i>Media LS</i> | <i>Sigma LS</i> | <i>Grupos Homogéneos</i> |
|-----------------------|--------------|-----------------|-----------------|--------------------------|
| Menor a 1 día | 7 | 8.39735 | 1.58569 | X- |
| (1 -3 día) | 6 | 10.4545 | 1.64135 | X- |
| Mayor a 3 días | 7 | 15.9669 | 1.58569 | -X |

| Contraste | Sig. | Diferencia (ug/mL) | +/- Límites (ug/mL) |
|---------------------------------------|-------------|---------------------------|----------------------------|
| Menor a 1 día - (1 -3 día) | | 2.05715 | 4.89484 |
| Menor a 1 día - Mayor a 3 días | * | 7.56955 | 4.8097 |
| (1 -3 día) - Mayor a 3 días | * | 5.5124 | 4.89484 |

* indica una diferencia significativa.

Fuente: Datos experimentales

Análisis e interpretación de datos:

Del gráfico N° 1 se desprende que el promedio de aceites y mantecas usadas por más de 3 días es 15,9669 ug/mL, concentración que se encuentra por encima de los límites permisibles establecidos por la comunidad Europea de 2 ug/mL y la Mailand-China de 10 ug/mL. Al igual que los resultados de aceites y mantecas con un uso de 1 a 3 días (promedio = 10.4545). Sin embargo el promedio de concentración de benzopireno en aceites y mantecas usadas menos de 1 día es 8.39735 ug/mL, que aún se encuentra en los límites permisibles menores a 10 ug/mL establecidos en Mailand- China, pero son elevados en comparación con los establecidos por la comunidad Europea.

En la tabla N° 2 se observa que en aceites con un uso mayor a 3 días generan 7,56955 más concentración de Benzopireno que en los aceites con un uso menor a 1 día. Igualmente se genera 5,5124 más de Benzopireno en los aceites usados más de 3 días comparados con los que se usaron entre 1 - 3 días. Por tanto se puede afirmar que existe una diferencia significativa entre el grupo de los aceites usados más de 3 días con respecto a los otros dos grupos.

TIPO DE ESTABLECIMIENTO:

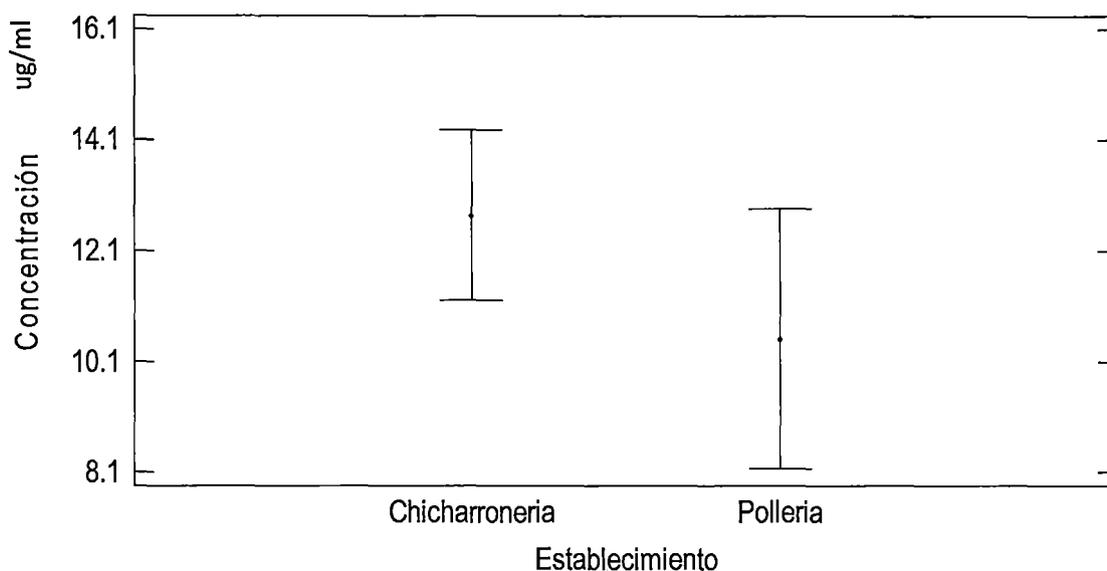
De la tabla N°1 se plantea las siguientes hipótesis estadísticas

- Ho: El tipo de establecimiento no influye en la concentración
- Hi: El tipo de establecimiento si influye en la concentración.

Del análisis de varianza bifactorial, se acepta Hi ($P \text{ valor} = 0.0278 < 0.05$), es decir el establecimiento si influye en la concentración.

- Para determinar qué establecimiento presenta mayor concentración se utiliza la prueba de tukey.

GRAFICO N° 2: CONCENTRACIÓN DE BENZOPIRENO EN LAS MUESTRAS TOMADAS DE CHICHARRONERIAS Y POLLERIAS DEL CENTRO HISTÓRICO DE CUSCO



Fuente: Datos experimentales

| <i>Nivel</i> | <i>Media</i> ($\mu\text{g/mL}$) | <i>Límite</i> <i>Inferior</i> ($\mu\text{g/mL}$) | <i>Límite</i> <i>Superior</i> ($\mu\text{g/mL}$) |
|------------------------|--------------------------------------|---|---|
| Establecimiento | | | |
| Chicharronería | 12.699 | 10.5142 | 14.8838 |
| Pollería | 10.5135 | 7.19449 | 13.8325 |

Fuente: Datos experimentales

TABLA N° 3: PRUEBA DE TUKEY – ESTABLECIMIENTO

Método: 95.0 porcentaje LSD

| Establecimiento | Casos | Media LS | Sigma LS | Grupos Homogéneos |
|------------------------|--------------|-----------------|-----------------|--------------------------|
| Pollería | 6 | 10.5135 | 1.54748 | X- |
| Chicharronería | 14 | 12.699 | 1.01867 | -X |

| Contraste | Sig. | Diferencia (ug/mL) | +/- Límites (ug/mL) |
|----------------------------------|-------------|-------------------------------|--------------------------------|
| Chicharronería - Pollería | * | 2.1855 | 3.97358 |

* indica una diferencia significativa.

Fuente: Datos experimentales

Análisis e interpretación de datos:

En la tabla N° 3 se observa que en las muestras usadas en Chicharronerías existe una diferencia de 2,1855 más de benzopireno que en las muestras analizadas de Pollerías.

Del gráfico N° 2 se desprende que el promedio de mantecas usadas en Chicharronerías (12,699 ug/mL) y el promedio de los aceites usados en pollerías (10.5135), sobrepasan los límites permisibles establecidos tanto por la comunidad Europea como por Mailand- China.

INTERACCION DE TIEMPO DE USO Y ESTABLECIMIENTO.

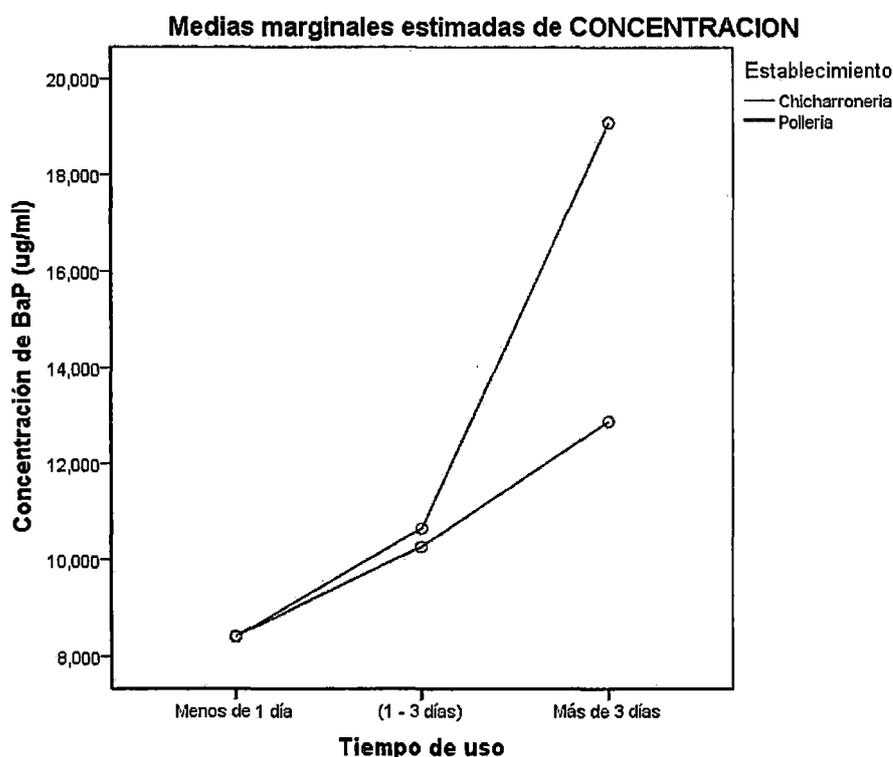
De la tabla N° 1 se plantea las siguientes hipótesis estadísticas:

- Ho: El tiempo de uso y el tipo de establecimiento no influyen simultáneamente en la concentración.
- Hi: El tiempo de uso y el tipo de establecimiento si influyen simultáneamente en la concentración.

Del análisis de varianza bifactorial, se acepta Hi ($P \text{ valor} = 0.0340 < 0.05$), es decir la interacción si influye en la concentración

Para determinar la combinación tiempo de uso y establecimiento que genera mayores niveles de concentración se tiene el siguiente gráfico.

Gráfico N° 3: RELACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE 3,4 BENZOPIRENO EN ACEITES Y MANTECAS COMESTIBLES SEGÚN EL TIEMPO DE USO EN CHICHARRONERÍAS Y POLLERÍAS DEL CENTRO HISTÓRICO DEL CUSCO



Fuente: Datos experimentales

| Nivel | Media (ug/mL) | Límite Inferior (ug/mL) | Límite Superior (ug/mL) |
|-----------------------------------|---------------|-------------------------|-------------------------|
| Tiempo de Uso por Establecimiento | | | |
| Menor a 1 día, Chicharronería | 8.3912 | 4.7554 | 12.027 |
| Menor a 1 día, Pollería | 8.4035 | 2.6548 | 14.1522 |
| (1 -3 día),Chicharronería | 10.645 | 6.58006 | 14.7099 |
| (1 -3 día),Pollería | 10.264 | 4.5153 | 16.0127 |
| Mayor a 3 días, Chicharronería | 19.0608 | 15.425 | 22.6966 |
| Mayor a 3 días, Pollería | 12.873 | 7.1243 | 18.6217 |

Fuente: Datos experimentales

Análisis e interpretación de datos:

Del gráfico N° 3 se desprende que la preparación de chicharrones con mantecas con un tiempo de uso mayor de 3 días genera altos niveles de concentración de Benzopireno (promedio 19,0608 ug/mL), igualmente las muestras usadas por más de 3 días en pollerías (promedio: 12.873 ug/mL) dichos valores se encuentran por encima de los límites permisibles establecidos por la comunidad Europea y los establecidos por Mailand - China de 10 ug/mL. En cambio en la preparación de chicharrones y pollos con aceite de menos de 1 día de uso el promedio de concentración es de 8.3912 ug/mL y 8.4035 ug/ mL respectivamente, estos valores se encuentran aún en los rangos establecidos por Mailand- China ya que son menores a 10 ug/mL pero no son aceptables por la comunidad Europea (2ug/mL)

Discusión de resultados:

Existe una relación entre el tiempo de uso y la concentración de Benzopireno en las muestras tal como lo respalda el estudio de Lichtfouse (84) donde sostiene que la producción de Benzopireno en las muestras está relacionada con la termodegradación de lípidos. En otro estudio Tyagi V.(98) muestra que a medida que avanza el tiempo el porcentaje de Benzopireno va creciendo en la muestra, después de 70 horas el porcentaje incrementó en un 79 % a 180 °C .

Por otro lado, la alta concentración de benzopireno en las mantecas usadas en chicharronerías comparada con las de pollerías se puede deber al elevado grado de colesterol en las muestras, ya que alimentos con menos contenido de grasas producen menos cantidad de benzopireno al ser fritos, esto se debe a que la formación de benzopireno en las muestras es ocasionado por la ciclación y posterior deshidrogenación del colesterol como lo indican De la Cruz y Huamán.

Otras razones que podrían justificar la elevada presencia de benzopireno en las mantecas usadas en chicharronerías son la forma de fritura (inmersión) y la temperatura a la cual se fríe como lo indica Lijinsky (96) en su estudio.

Resultados similares obtuvieron en su investigación Tsuzuki et al. (97) puesto que diferentes tipos de aceites vegetales calentados a 180°C presentaron

pequeños cambios en su perfil en Benzopireno después de 4 horas de calentamiento, los que se acrecentaron cuando los aceites fueron calentados a temperaturas superiores a 200°C; sin embargo, en estos aceites el contenido de BaP no supera el 1%, lo que ratificaría el menor impacto sobre este tipo de ácidos grasos al someter a calentamiento a aceites vegetales como los usados en las pollerías.

TABLA N° 4. RELACIÓN ENTRE EL GRADO DE ALTERACIÓN DE LAS MUESTRAS SEGÚN PRUEBA COLORIMÉTRICA DE OXIFRIT- TEST Y TIEMPO DE USO DE LA MUESTRA.

| | | | Grado de alteración según Oxifrit Test | | | | Total |
|---------------|----------------|------------|--|---------------|--------------|---------------------|--------|
| | | | Sin alteración | Poco alterado | Muy alterado | Totalmente Alterado | |
| Tiempo de uso | Menos de 1 día | Frecuencia | 5 | 2 | 0 | 0 | 7 |
| | | Porcentaje | 71,4% | 28,6% | ,0% | ,0% | 100,0% |
| | (1 - 3 días) | Frecuencia | 1 | 2 | 2 | 1 | 6 |
| | | Porcentaje | 16,7% | 33,3% | 33,3% | 16,7% | 100,0% |
| | Más de 3 días | Frecuencia | 0 | 0 | 1 | 6 | 7 |
| | | Porcentaje | ,0% | ,0% | 14,3% | 85,7% | 100,0% |
| Total | | Frecuencia | 6 | 4 | 3 | 7 | 20 |
| | | Porcentaje | 30,0% | 20,0% | 15,0% | 35,0% | 100,0% |

Prueba chi-cuadrado, $p=0,04$

Fuente: Datos experimentales

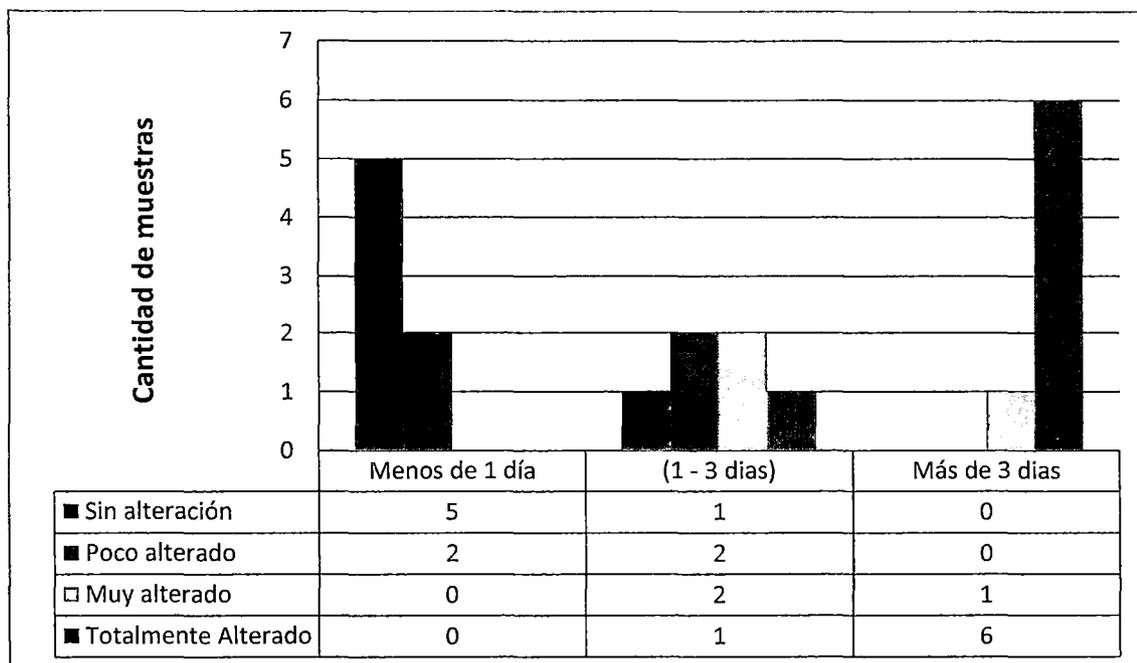
Se plantea las siguientes hipótesis estadísticas:

- Ho: El tiempo de uso no influye en el grado de alteración según Oxifrit Test.
- Hi: El tiempo de uso si influye en el grado de alteración según Oxifrit Test.

De la prueba chi-cuadrado al 95% de confianza se concluye que existe relación entre tiempo de uso y Grado de alteración según Oxifrit Test ($p=0,04 < 0,05$).

El tipo de relación es directa a menos de 1 día de uso en un 71,4% el grado de alteración está en el rango de sin alteración, en cambio a más de 3 días de uso en un 85,7% el grado está totalmente alterado.

GRAFICO N° 4. RELACIÓN ENTRE EL GRADO DE ALTERACIÓN DE LAS MUESTRAS SEGÚN PRUEBA COLORIMÉTRICA DE OXIFRIT- TEST Y TIEMPO DE USO DE LA MUESTRA.



Fuente: Datos experimentales

Análisis e Interpretación de resultados:

La Tabla Y Gráfico N° 4 muestra el grado de alteración según el Oxifrit- test en relación con el tiempo de uso de la manteca, se observa que para las mantecas que tienen un uso “Menor a 1 día” el 71.4 % tienen como resultado “Sin alteración” y el 28.6 % “poco alterado”; de los aceites usados entre “1 – 3 días” se observa que existe un 16.7 % para los resultados de “Sin alteración ” y otros 16,7% para “totalmente alterado”, y en un 33.3% tanto para “poco alterado” como para “Muy alterado”. Mientras tanto en los resultados para las mantecas de “más de 3 días” se observa que en un 14 % las muestras están en “Muy alterado” y en un 85.7 % en estado “Totalmente Alterado”

Se observa que existen más muestras en estado totalmente alterado en las mantecas que tienen un uso mayor a 3 días, y en mantecas con uso menor a 1 día hay más muestras con resultado “Sin alteración”. Al aplicar la prueba del chi cuadrado el nivel de significancia de la prueba es 0.04 , es decir que al ser

menor de 0,05 se puede afirmar que existe una relación entre ambas variables, por lo tanto a mayor tiempo de uso de la manteca o aceite utilizado, el grado de alteración también ira aumentando.

Discusión:

Los resultados concuerdan con los obtenidos por Zamorano (90) donde se observa que todas las mantecas hidrogenadas mostraron un comportamiento similar en el ensayo de Oxifrit, el cual indicó que las grasas estaban sin alteración hasta las 30 h de calentamiento, hubo un cambio para las 40 h y totalmente alterados para las 50 h.

Figura N° 19 Cromatogramas de estándar de Benzopireno y una muestra de manteca^o de chicharronería.

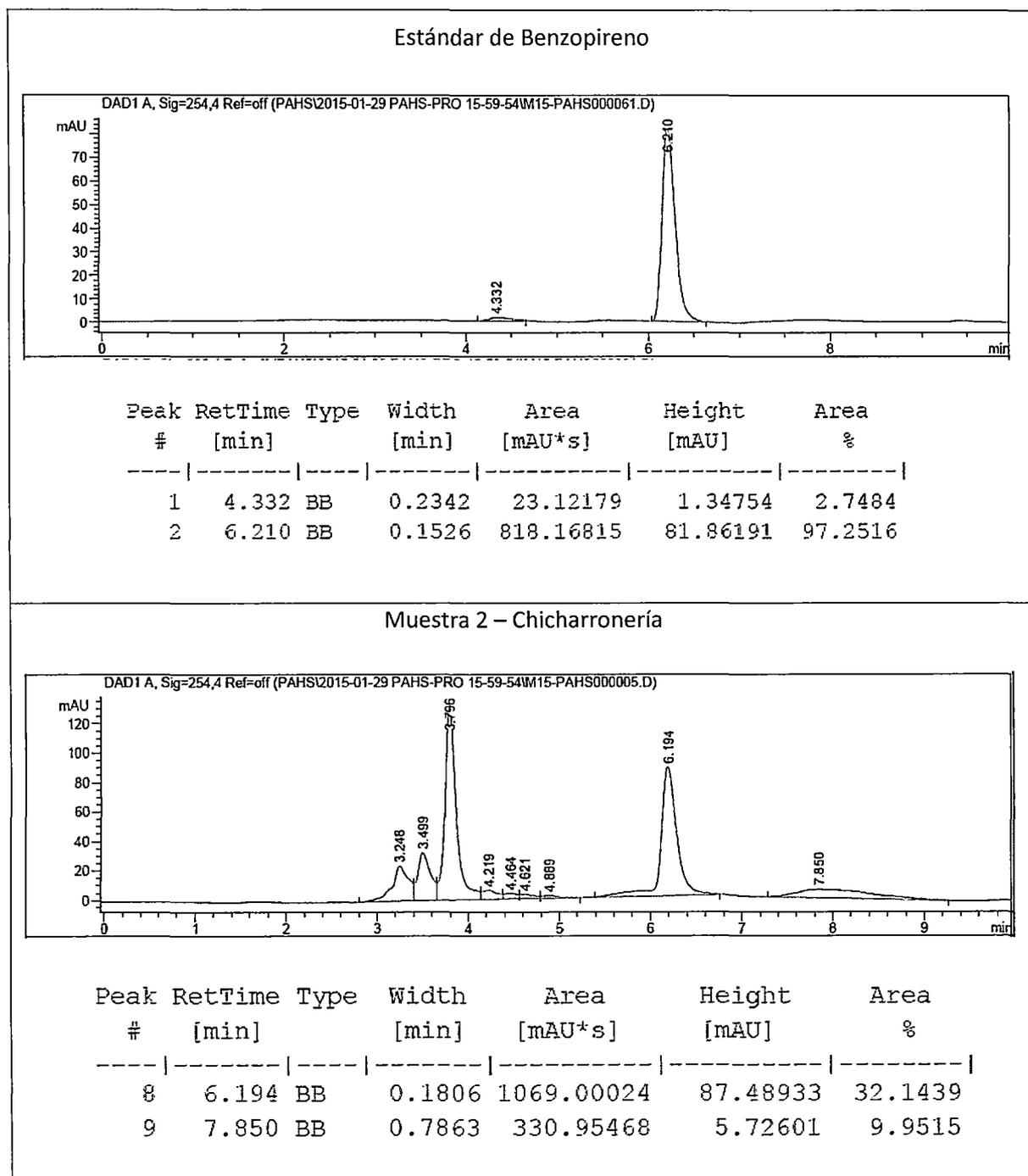


Figura n°19: Cromatogramas del estándar de benzopireno y de la muestra n° 2 de mantecas usadas en chicharronerías, el estándar (Tr = 6.210) con un pico a 81.86191 mAU y un área de 818.16815 mAU *s, la muestra 2 (Tr = 6.194) con un pico de absorbancia a 87.48933 mAU y un área de 1069.00024 mAU *s, área mucho mayor a la del estándar.

Figura N° 20 Cromatogramas de estándar de Benzopireno y una muestra de aceite de pollería.

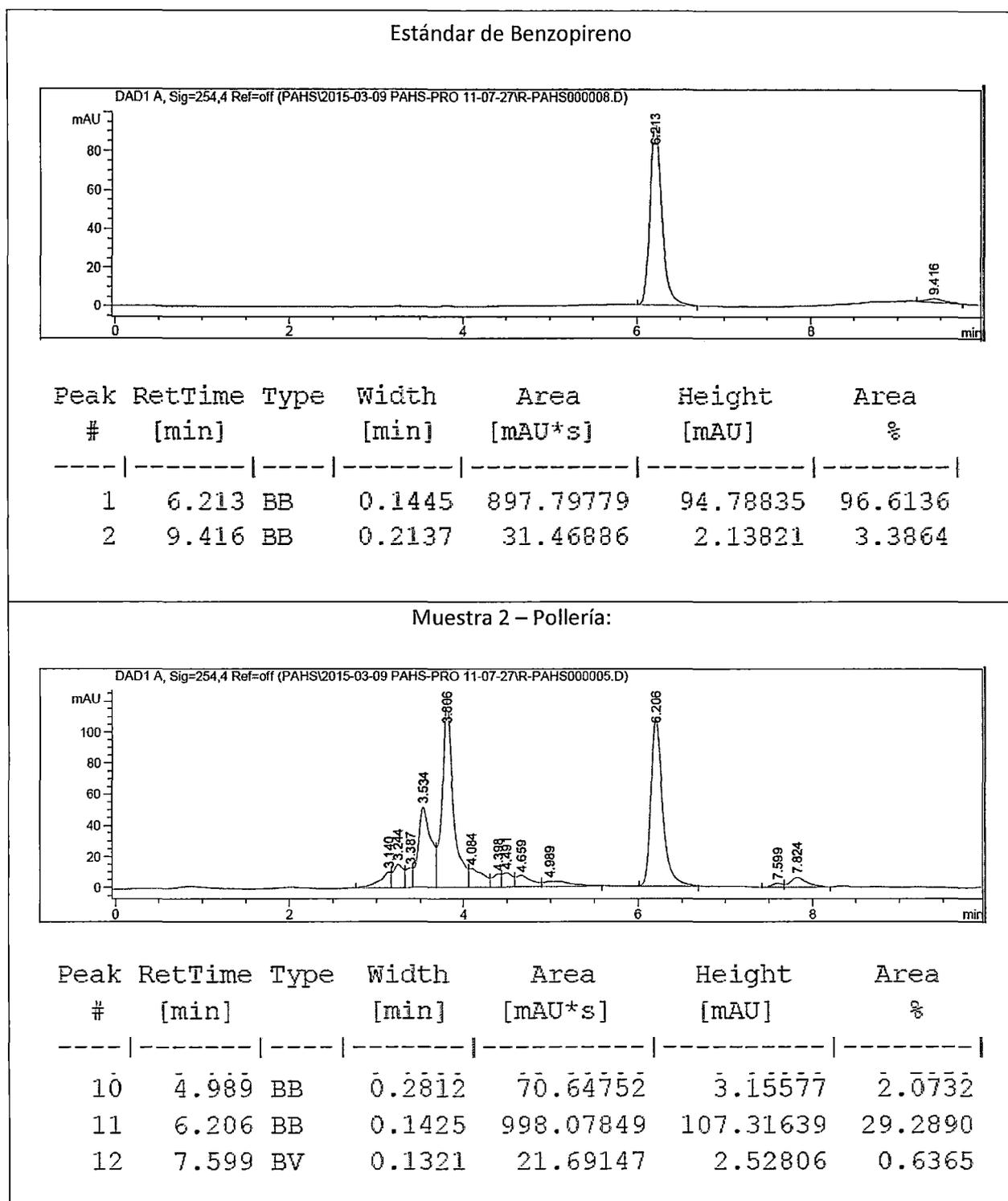


Figura n° 20: Cromatogramas del estándar de benzopireno y de la muestra n° 2 de aceites usados en chicharronerías, el estándar (Tr = 6.213) con un pico a 94.78835 mAU y un área de 897.79779 mAU *s, la muestra 2 (Tr = 6.206) con un pico de absorbancia a 107.31639 mAU y un área de 998.07849 mAU *s.

- **APLICANDO LA FÓRMULA PARA CUANTIFICAR NIVELES DE BAP POR ADICIÓN DE ESTÁNDAR PARA LA FIGURA N° 19:**

$$BaP \left(\frac{ug}{mL} \right) = \frac{(Am - As) \times 100 \text{ ug/mL}}{As}$$

Tenemos:

$$BaP \left(\frac{ug}{mL} \right) = \frac{(1069.00024 - 815.99831) \times 100 \text{ ug/mL}}{818.16815}$$

$$BaP \left(\frac{ug}{mL} \right) = 31.0052027 \text{ ug/mL}$$

Donde:

Am = 1069.00024

As = 815.99831

100 ug/mL = Concentración de estándar de BaP.

- **APLICANDO LA FÓRMULA PARA CUANTIFICAR NIVELES DE BAP POR ADICIÓN DE ESTÁNDAR PARA LA FIGURA N° 20:**

$$BaP \left(\frac{ug}{mL} \right) = \frac{(Am - As) \times 100 \text{ ug/mL}}{As}$$

Tenemos:

$$BaP \left(\frac{ug}{mL} \right) = \frac{(998.07849 - 906.144225) \times 100 \text{ ug/mL}}{906.144225}$$

$$BaP \left(\frac{ug}{mL} \right) = 10.14565479 \text{ ug/mL}$$

Donde:

Am = 998.07849

As = 906.144225

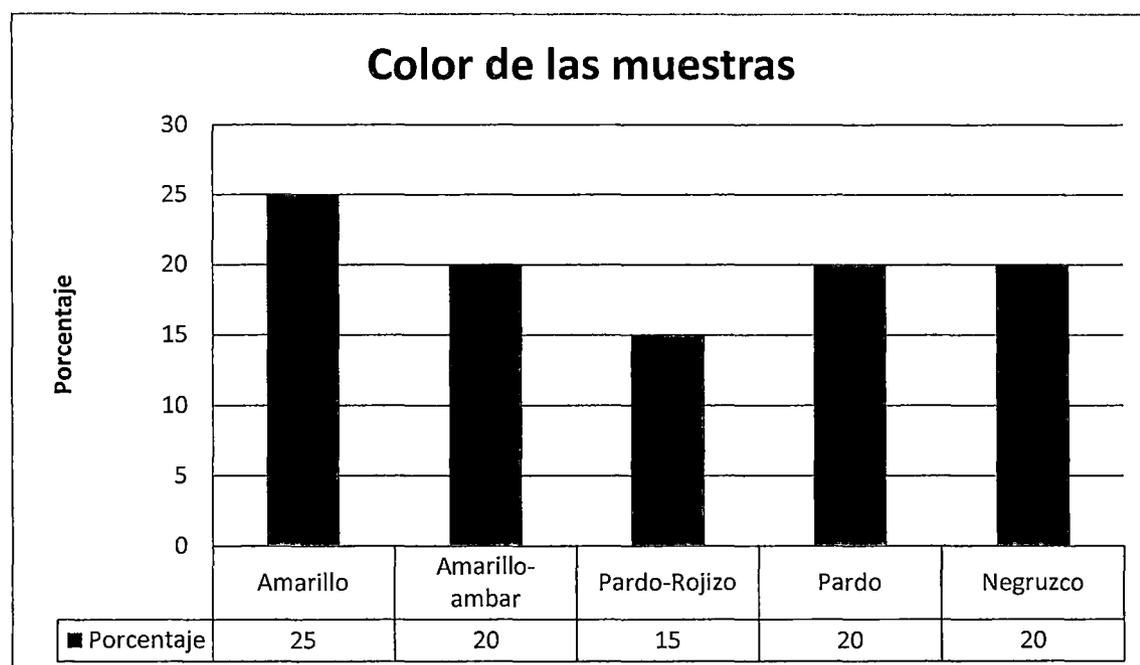
100 ug/mL = Concentración de estándar de BaP.

TABLA N° 5: DISTRIBUCION DEL COLOR DE LAS MUESTRAS DE ACEITE Y MANTECA UTILIZADAS EN LA FRITURA EN CHICHARRONERIAS Y POLLERIAS DEL CENTRO HISTORICO DEL CUSCO- ENERO 2015.

| | Frecuencia | Porcentaje |
|----------------|------------|------------|
| Amarillo | 5 | 25,0 |
| Amarillo-ambar | 4 | 20,0 |
| Pardo-Rojizo | 3 | 15,0 |
| Pardo | 4 | 20,0 |
| Negruzco | 4 | 20,0 |
| Total | 20 | 100,0 |

Fuente: Ficha de recolección de datos

GRAFICO N° 5: DISTRIBUCION DEL COLOR DE LAS MUESTRAS DE ACEITE Y MANTECA UTILIZADAS EN LA FRITURA EN CHICHARRONERIAS Y POLLERIAS DEL CENTRO HISTORICO DEL CUSCO- ENERO 2015.



Fuente: Ficha de recolección de datos

TABLA N° 6: RELACIÓN ENTRE EL COLOR DE LAS MUESTRAS Y EL GRADO DE ALTERACIÓN SEGÚN PRUEBA COLORIMÉTRICA DE OXIFRIT- TEST.

| | | | Color | | | | | Total |
|--|---------------------|------------|----------|--------------------|------------------|-------|----------|-------|
| | | | Amarillo | Amarillo- ambar | Pardo- Rojizo | Pardo | Negruzco | |
| Grado de alteración según Oxifrit Test | Sin alteración | Frecuencia | 4 | 1 | 1 | 0 | 0 | 6 |
| | | Porcentaje | 20,0% | 5,0% | 5,0% | ,0% | ,0% | 30,0% |
| | Poco alterado | Frecuencia | 1 | 3 | 0 | 0 | 0 | 4 |
| | | Porcentaje | 5,0% | 15,0% | ,0% | ,0% | ,0% | 20,0% |
| | Muy alterado | Frecuencia | 0 | 0 | 2 | 1 | 0 | 3 |
| | | Porcentaje | ,0% | ,0% | 10,0% | 5,0% | ,0% | 15,0% |
| | Totalmente Alterado | Frecuencia | 0 | 0 | 0 | 3 | 4 | 7 |
| | | Porcentaje | ,0% | ,0% | ,0% | 15,0% | 20,0% | 35,0% |
| Total | Frecuencia | 5 | 4 | 3 | 4 | 4 | 20 | |
| | Porcentaje | 25,0% | 20,0% | 15,0% | 20,0% | 20,0% | 100,0% | |

p= 0.001

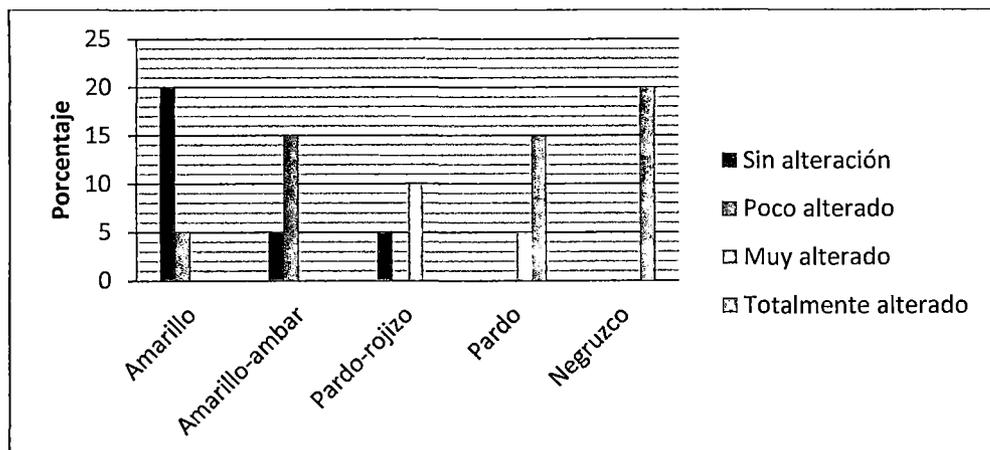
Fuente: Ficha de recolección de datos

Se plantea las siguientes hipótesis estadísticas:

- Ho: El color de la muestra no influye en el grado de alteración.
- Hi: El color de la muestra si influye en el grado de alteración.

De la prueba chi-cuadrado al 95% de confianza se concluye que existe relación entre el color y Grado de alteración según Oxifrit Test ($p=0,001 < 0,05$).

GRAFICO N° 6: RELACIÓN ENTRE EL COLOR DE LAS MUESTRAS Y EL GRADO DE ALTERACIÓN SEGÚN PRUEBA COLORIMÉTRICA DE OXIFRIT- TEST.



Fuente: Ficha de recolección de datos

Análisis e Interpretación:

La tabla y gráfico N° 5 muestra que en 5 casos (25 %) el color de la manteca usada es amarillo, en 4 muestras cambia a color amarillo- ambar (20 %), y son de color pardo- rojizo en 3 (15 %) , finalmente en 4 casos son pardo y negruzco respectivamente (20 %). Estas últimas coloraciones son indicadas en el Codex de productos alimentarios como no aptas para el consumo humano.

De la tabla y gráfico N° 6 se desprende que existe una relación directa entre el grado de alteración y la coloración de la muestra, ya que de las 6 muestras que están sin alteración , 4 de ellas son de color amarillo, 1 amarillo- ambar , 1 pardo rojizo y ninguna de ellas tiene coloración pardo o negruzco. Al igual que los aceites que se encuentran totalmente alterados, que de 7 muestras 3 de ellos tienen una coloración parda ,4 son de color negruzco y ninguno conserva una coloración normal.

Discusión:

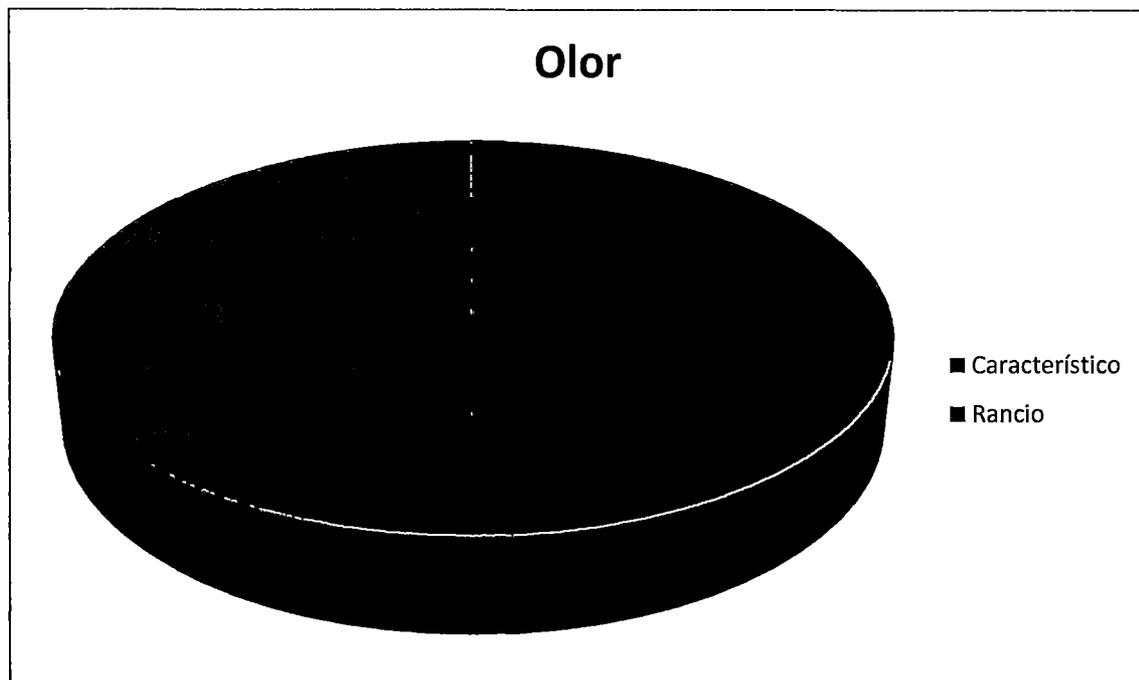
Cuanto más alterado está el aceite se produce un cambio de coloración, esto se debe al oscurecimiento de la manteca o aceite usado debido al tiempo de utilización de esta para la fritura, es decir que sufre un proceso de oxidación lo cual origina cambios organolépticos del aceite (alteración del sabor, palatabilidad, oscurecimiento del aceite) (86).

TABLA N° 7: DISTRIBUCION DEL OLOR DE LAS MUESTRAS DE ACEITES Y MANTECAS UTILIZADAS EN LA FRITURA EN CHICHARRONERIAS Y POLLERIAS DEL CENTRO HISTORICO DEL CUSCO- ENERO 2015.

| | | Frecuencia | Porcentaje |
|---------|----------------|------------|------------|
| Válidos | Característico | 10 | 50,0 |
| | Rancio | 10 | 50,0 |
| | Total | 20 | 100,0 |

Fuente: Ficha de recolección de datos

GRAFICO N° 7: DISTRIBUCION DEL OLOR DE LAS MUESTRAS DE ACEITES Y MANTECAS UTILIZADAS EN LA FRITURA EN CHICHARRONERIAS Y POLLERIAS DEL CENTRO HISTORICO DEL CUSCO- ENERO 2015.



Fuente: Ficha de recolección de datos

TABLA N° 8 : RELACIÓN ENTRE EL OLOR DE LAS MUESTRAS Y EL GRADO DE ALTERACIÓN SEGÚN PRUEBA COLORIMÉTRICA DE OXIFRIT- TEST.

| | | | Olor | | Total |
|--|---------------------|-------------|----------------|--------|--------|
| | | | Característico | Rancio | |
| Grado de alteración según Oxifrit Test | Sin alteración | Recuento | 6 | 0 | 6 |
| | | % del total | 30,0% | ,0% | 30,0% |
| | Poco alterado | Recuento | 3 | 1 | 4 |
| | | % del total | 15,0% | 5,0% | 20,0% |
| | Muy alterado | Recuento | 1 | 2 | 3 |
| | | % del total | 5,0% | 10,0% | 15,0% |
| | Totalmente Alterado | Recuento | 0 | 7 | 7 |
| | | % del total | ,0% | 35,0% | 35,0% |
| Total | | Recuento | 10 | 10 | 20 |
| | | % del total | 50,0% | 50,0% | 100,0% |

p= 0.002

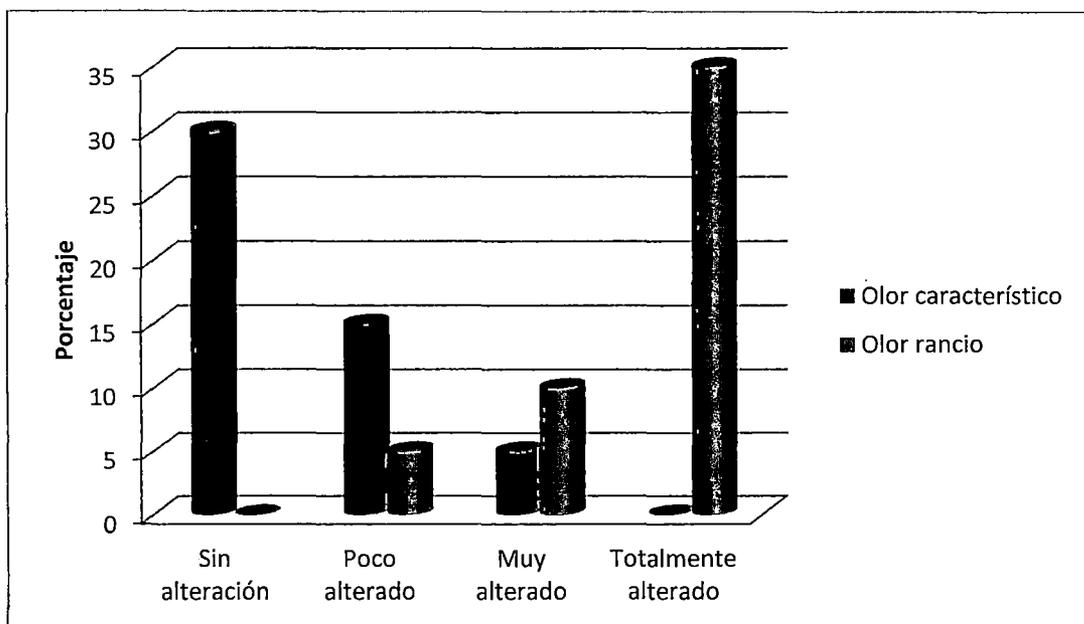
Fuente: Ficha de recolección de datos

Se plantea las siguientes hipótesis estadísticas:

- Ho: El olor de la muestra no influye en el grado de alteración.
- Hi: El olor de la muestra si influye en el grado de alteración.

De la prueba chi-cuadrado al 95% de confianza se concluye que existe relación entre el olor y Grado de alteración según Oxifrit Test ($p=0,002 < 0,05$).

GRAFICO N° 8 : RELACIÓN ENTRE EL OLOR DE LAS MUESTRAS Y EL GRADO DE ALTERACIÓN SEGÚN PRUEBA COLORIMÉTRICA DE OXIFRIT- TEST.



Fuente: Ficha de recolección de datos

Análisis e interpretación:

Se observa en la tabla y gráfico N° 7 que en 10 casos (50 %) el olor de la muestra usada es rancio en otros 10 aún se conserva el olor característico. Según el Codex Alimentario.

Sin embargo de la tabla y gráfico N° 8 se puede confirmar que si existe una diferencia significativa entre el olor de la muestra y el grado de alteración, ya que de 10 muestras que conservan su olor característico 6 (30 %) se encuentran sin alteración, 3 (15 %) se encuentran poco alterados y solo 1 (5 %) de ellas está muy alterado. Igualmente, las muestras con un olor rancio solo

1(5 %) de ellas está poco alterado, 2 (10 %) se encuentran muy alteradas y 7 (35 %) están totalmente alteradas.

Discusión:

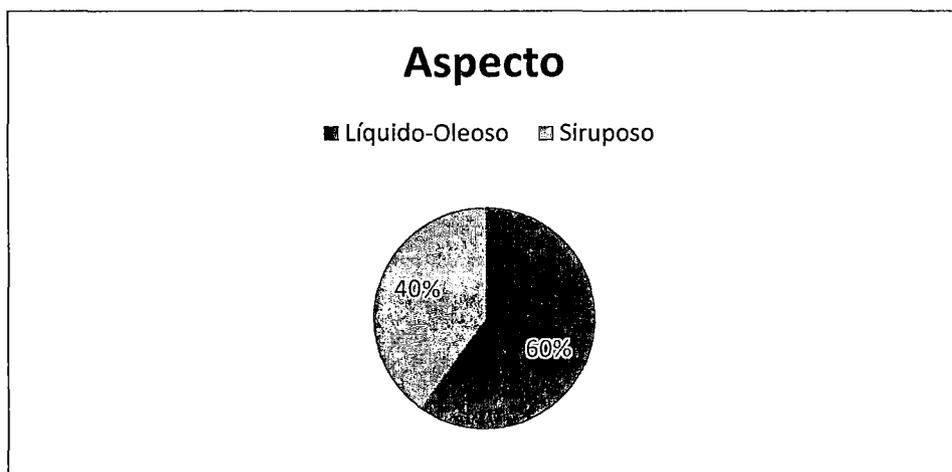
El olor rancio que existe en la mayoría de las muestras alteradas es debido a que cuando las mantecas son expuestas demasiado tiempo en el proceso de fritura sufren reacciones de alteración como la hidrólisis y la oxidación que cambian el olor de la muestra a uno más rancio.(91)

TABLA N° 9: DISTRIBUCION DEL ASPECTO DE LAS MUESTRAS DE ACEITE Y MANTECA UTILIZADAS EN LA FRITURA EN CHICHARRONERIAS Y POLLERIAS DEL CENTRO HISTORICO DEL CUSCO- ENERO 2015.

| | | Frecuencia | Porcentaje |
|---------|----------------|------------|------------|
| Válidos | Líquido-Oleosa | 12 | 60,0 |
| | Siruposa | 8 | 40,0 |
| | Total | 20 | 100,0 |

Fuente: Ficha de recolección de datos

GRAFICO N° 9: DISTRIBUCION DEL ASPECTO DE LAS MUESTRAS DE ACEITE Y MANTECA UTILIZADAS EN LA FRITURA EN CHICHARRONERIAS Y POLLERIAS DEL CENTRO HISTORICO DEL CUSCO- ENERO 2015.



Fuente: Ficha de recolección de datos

TABLA N° 10 : RELACIÓN ENTRE EL ASPECTO DE LAS MUESTRAS Y EL GRADO DE ALTERACIÓN SEGÚN PRUEBA COLORIMÉTRICA DE OXIFRIT- TEST.

| | | | Aspecto | | Total |
|--|---------------------|-------------|----------------|----------|--------|
| | | | Líquido-Oleosa | Siruposa | |
| Grado de alteración según Oxifrit Test | Sin alteración | Recuento | 6 | 0 | 6 |
| | | % del total | 30,0% | ,0% | 30,0% |
| | Poco alterado | Recuento | 4 | 0 | 4 |
| | | % del total | 20,0% | ,0% | 20,0% |
| | Muy alterado | Recuento | 2 | 1 | 3 |
| | | % del total | 10,0% | 5,0% | 15,0% |
| | Totalmente Alterado | Recuento | 0 | 7 | 7 |
| | | % del total | ,0% | 35,0% | 35,0% |
| Total | | Recuento | 12 | 8 | 20 |
| | | % del total | 60,0% | 40,0% | 100,0% |

P=0.001

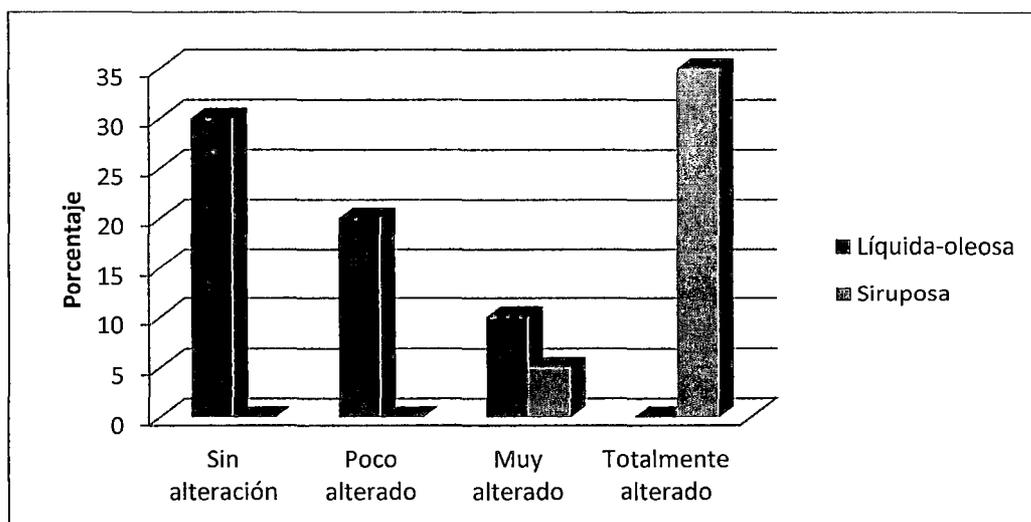
Fuente: Ficha de recolección de datos

Se plantea las siguientes hipótesis estadísticas:

- Ho: El aspecto de la muestra no influye en el grado de alteración.
- Hi: El aspecto de la muestra si influye en el grado de alteración.

De la prueba chi-cuadrado al 95% de confianza se concluye que existe relación entre el aspecto y Grado de alteración según Oxifrit Test ($p=0,001 < 0,05$).

GRAFICO N° 10 : RELACIÓN ENTRE EL ASPECTO DE LAS MUESTRAS Y EL GRADO DE ALTERACIÓN SEGÚN PRUEBA COLORIMÉTRICA DE OXIFRIT- TEST.



Fuente: Ficha de recolección de datos

Análisis e interpretación:

Según la tabla y gráfico N° 9 en 12 de los casos (60 %) la muestra conserva aún un aspecto líquido oleoso aceptado por las normas del codex alimentario, mientras que en 8 muestras (40 %) la consistencia de la manteca es siruposa es decir que según el Codex alimentario, estas muestras ya no están aptas para su uso.

Se observa que hay una relación directa entre el aspecto de la muestra y su grado de alteración, como se desprende del gráfico y tabla N° 10 en donde se muestra que de 12 muestras que aún conservan su aspecto líquido oleoso, 6 (30 %) de ellas se encuentran sin alteración, 4 (20 %) poco alterado y 2 (10%) de ellas están muy alteradas; y de las 8 muestras que tienen un aspecto siruposo, 7 (35 %) están totalmente alteradas y 1 (5 %) de ellas se encuentran muy alteradas.

Discusión:

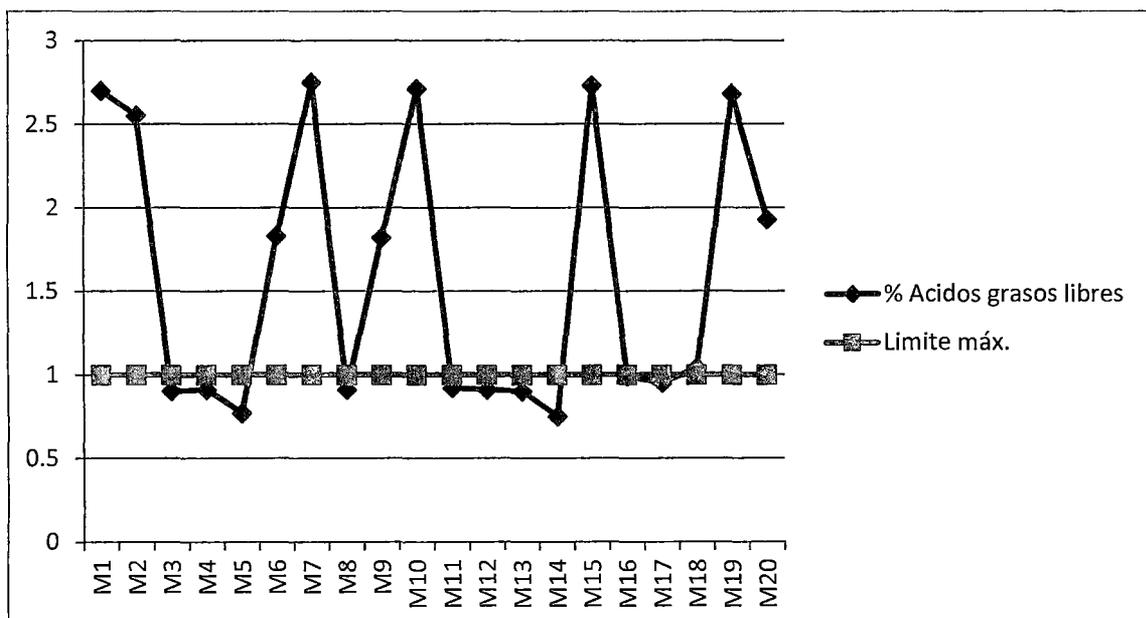
El aspecto siruposo de las muestras se debe al incremento de la viscosidad del aceite, que es característico de las muestras excesivamente reutilizadas para el proceso de fritura. (89)

TABLA N° 11. INDICE DE ACIDEZ (% DE ACIDO OLEICO) DE LAS MUESTRAS USADAS EN CHICHARRONERIAS Y POLLERIAS DEL CENTRO HISTORICO DEL CUSCO - ENERO 2015.

| Muestra | % DE ACIDO OLEICO | Muestra | % DE ACIDO OLEICO |
|---------|-------------------|---------|-------------------|
| M1 | 2,70 | M11 | 0,92 |
| M2 | 2,55 | M12 | 0,91 |
| M3 | 0,90 | M13 | 0,90 |
| M4 | 0,91 | M14 | 0,75 |
| M5 | 0,77 | M15 | 2,73 |
| M6 | 1,83 | M16 | 0,99 |
| M7 | 2,75 | M17 | 0,95 |
| M8 | 0,91 | M18 | 1,04 |
| M9 | 1,82 | M19 | 2,68 |
| M10 | 2,71 | M20 | 1,93 |

Fuente: Datos experimentales

GRAFICO N° 11. INDICE DE ACIDEZ (% DE ACIDO OLEICO) DE LAS MUESTRAS USADAS EN CHICHARRONERIAS Y POLLERIAS DEL CENTRO HISTORICO DEL CUSCO - ENERO 2015.



Fuente: Datos experimentales

TABLA N° 12. RELACION ENTRE INDICE DE ACIDEZ (% DE ACIDO OLEICO) DE LAS MUESTRAS USADAS EN CHICHARRONERIAS Y POLLERIAS DEL CENTRO HISTORICO DEL CUSCO Y SU GRADO DE ALTERACION.

| | | | Grado de alteración según Oxifrit Test | | | | Total |
|------------------|--------------------|------------|--|---------------|--------------|---------------------|--------|
| | | | Sin alteración | Poco alterado | Muy alterado | Totalmente Alterado | |
| Indice de acidez | Límites Normales | Frecuencia | 6 | 3 | 0 | 1 | 10 |
| | | Porcentaje | 60,0% | 30,0% | ,0% | 10,0% | 100,0% |
| | Excede los límites | Frecuencia | 0 | 1 | 3 | 6 | 10 |
| | | Porcentaje | ,0% | 10,0% | 30,0% | 60,0% | 100,0% |
| Total | Frecuencia | 6 | 4 | 3 | 7 | 20 | |
| | Porcentaje | 30,0% | 20,0% | 15,0% | 35,0% | 100,0% | |

$p= 0.004$

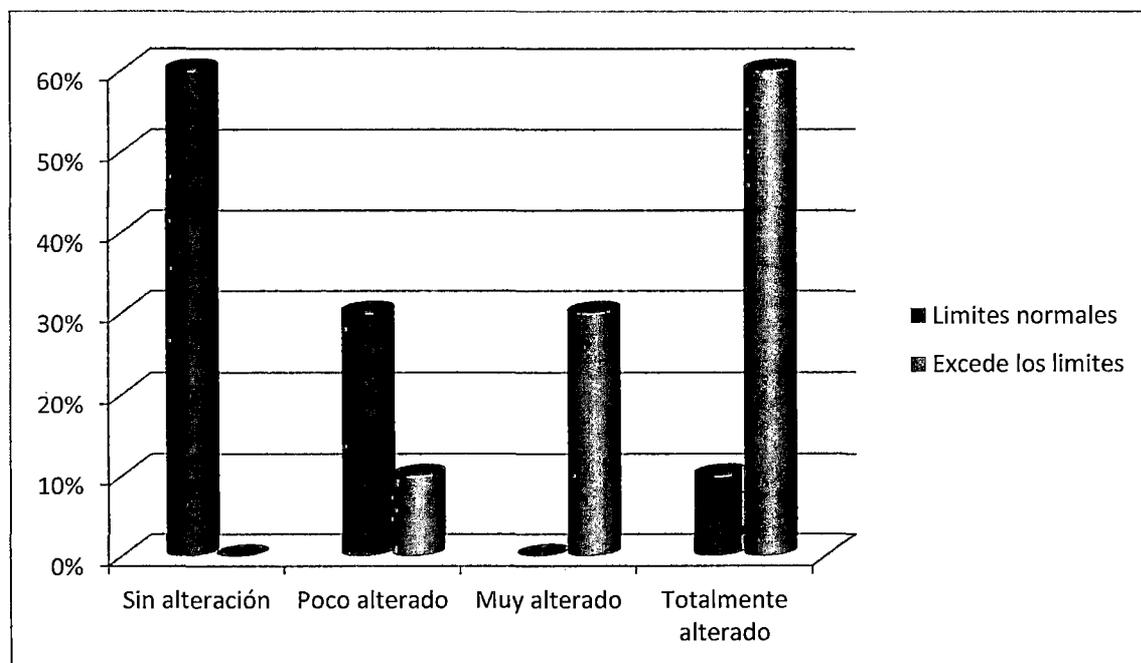
Fuente: Datos experimentales

Se plantea las siguientes hipótesis estadísticas:

- Ho: El índice de acidez de las muestras no influye en el grado de alteración.
- Hi: El índice de acidez de las muestras si influye en el grado de alteración.

De la prueba chi-cuadrado al 95% de confianza se concluye que existe relación entre el índice de acidez de las muestras y el grado de alteración.

GRAFICO N° 12. RELACION ENTRE INDICE DE ACIDEZ (% DE ACIDO OLEICO) DE LAS MUESTRAS USADAS EN CHICHARRONERIAS Y POLLERIAS DEL CENTRO HISTORICO DEL CUSCO Y SU GRADO DE ALTERACION.



Fuente: Datos experimentales

Análisis e Interpretación:

El índice de acidez se determinó mediante el análisis de ácidos grasos libres de acuerdo al método oficial de la A.O.C.S (Asociación de Químicos Analíticos Oficiales) para muestras de aceite y grasas.

En la determinación del índice de Acidez (Gráfico y tabla N° 11) se observó que 10 muestras (50 %) pasan el límite de 1 % establecido por el CODEX PARA GRASAS ANIMALES ESPECIFICADAS (CODEX STAN 211) esto es indicativo de un alto nivel de hidrólisis en las muestras. El valor más alto obtenido en el estudio según la tabla y gráfico N° 12 fue la muestra 15 con 2.73 % y el menor fue la muestra 14 con 0.75 %, con una media de 1,836 %.

Discusión de resultados:

Del gráfico y tabla N° 12 se observa que los valores de índice de acidez en las muestras de los aceites alterados por recalentamiento sobrepasan el límite

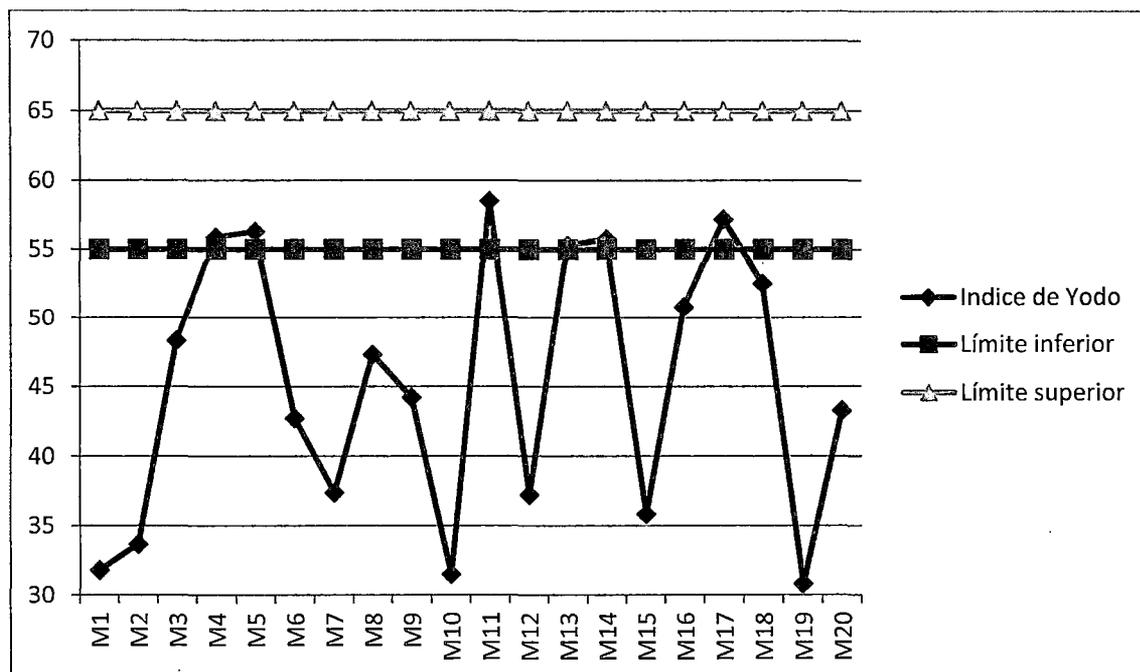
establecido, esto podría ocurrir debido al elevado tiempo de fritura y poca conservación de la grasa como se observa en diversos estudios, Del Blanco y López (2006) demuestran que la acidez siempre aumenta conforme avanza el tiempo de fritura, este comportamiento es independiente al tipo de aceite utilizado. En el estudio de Rivera Y. (87) se evidencia un ascenso del Índice de acidez al tener mayor tiempo de procesamiento, observándose que los mayores valores fueron obtenidos en los establecimientos donde hubo mayor tiempo de uso de estos aceites en comparación a los restantes establecimientos. Estos resultados también coinciden con los mostrados por Albarracín y col (94) que demuestran que el grado de acidez en las muestras de aceite sin uso y usados son diferentes a un nivel de significación α de 5%. Este fenómeno es producido como lo explica Navas (95) a consecuencia de la presencia de agua proveniente del producto que se fríe, que junto a las elevadas temperaturas de la fritura, favorecen la reacción de hidrólisis de los triacilglicérols dando lugar a ácidos grasos libres. El aumento de acidez se ve acentuado cuando la renovación de aceite no es suficiente.

TABLA N° 13. INDICE DE YODO DE LAS MUESTRAS USADAS EN CHICHARRONERIAS Y POLLERIAS DEL CENTRO HISTORICO DEL CUSCO - ENERO 2015.

| Muestra | I. de Yodo | Muestra | I. de Yodo |
|----------------|-------------------|----------------|-------------------|
| M1 | 31,78 | M11 | 58,49 |
| M2 | 33,65 | M12 | 37,21 |
| M3 | 48,30 | M13 | 55,25 |
| M4 | 55,85 | M14 | 55,74 |
| M5 | 56,27 | M15 | 35,81 |
| M6 | 42,71 | M16 | 50,79 |
| M7 | 37,38 | M17 | 57,13 |
| M8 | 47,28 | M18 | 52,50 |
| M9 | 44,18 | M19 | 30,79 |
| M10 | 31,49 | M20 | 43,26 |

Fuente: Datos experimentales

GRAFICO N° 13. INDICE DE YODO DE LAS MUESTRAS USADAS EN CHICHARRONERIAS Y POLLERIAS DEL CENTRO HISTORICO DEL CUSCO - ENERO 2015.



Fuente: Datos experimentales

TABLA N° 14. RELACION ENTRE INDICE DE YODO DE LAS MUESTRAS USADAS EN CHICHARRONERIAS Y POLLERIAS DEL CENTRO HISTORICO DEL CUSCO Y SU GRADO DE ALTERACION.

| | | | Grado de alteración según Oxifrit Test | | | | Total |
|----------------|--------------------|------------|--|---------------|--------------|---------------------|--------|
| | | | Sin alteración | Poco alterado | Muy alterado | Totalmente Alterado | |
| Índice de Yodo | Límites normales | Frecuencia | 6 | 1 | 0 | 0 | 7 |
| | | Porcentaje | 85,7% | 14,3% | ,0% | ,0% | 100,0% |
| | Excede los límites | Frecuencia | 0 | 3 | 3 | 7 | 13 |
| | | Porcentaje | ,0% | 23,1% | 23,1% | 53,8% | 100,0% |
| Total | | Frecuencia | 6 | 4 | 3 | 7 | 20 |
| | | Porcentaje | 30,0% | 20,0% | 15,0% | 35,0% | 100,0% |

$p= 0.001$

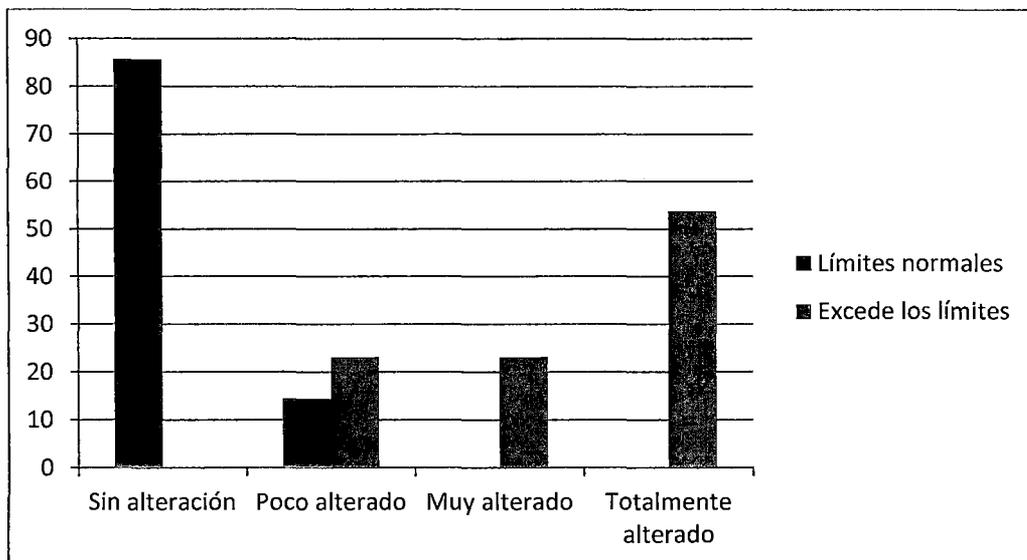
Fuente: Datos experimentales

Se plantea las siguientes hipótesis estadísticas:

- Ho: El índice de yodo de las muestras no influye en el grado de alteración.
- Hi: El índice de yodo de las muestras si influye en el grado de alteración.

De la prueba chi-cuadrado al 95% de confianza se concluye que existe relación entre el índice de yodo de las muestras y el grado de alteración.

GRAFICO N° 14. RELACION ENTRE INDICE DE YODO DE LAS MUESTRAS USADAS EN CHICHARRONERIAS Y POLLERIAS DEL CENTRO HISTORICO DEL CUSCO Y SU GRADO DE ALTERACION.



Fuente: Datos experimentales

Análisis e Interpretación:

Para la determinación del índice de yodo se utilizó la técnica oficial aceptada por A.O.A.C. (Asociación de Químicos Analíticos Oficiales) para muestras de aceite y grasas. Se observa en la Tabla y gráfico N° 14 que los niveles de índice de yodo se encuentran por debajo de los valores establecidos por el CODEX PARA GRASAS ANIMALES ESPECIFICADAS (85) que van desde 65 a 55.

Los valores obtenidos en nuestro estudio (Tabla y gráfico N° 13) para muestras de manteca y aceite vegetal van desde un valor máximo de 58,49 a un mínimo de 30.79, con una media de 44.7933. El 65 % de estos resultados están fuera de los límites establecidos. Resultados similares obtuvo Rodriguez (94) que encontró un rango de índice de yodo de 40-55 g/100g de manteca.

Discusión de resultados:

La disminución del índice de yodo se debe a que se comienzan a formar enlaces saturados al calentar la grasa así lo demuestran los estudios realizados por De la Cruz y Huamán (92) donde se observa una marcada disminución de los valores del índice de yodo a medida que el tiempo de uso del aceite aumenta, esto debido a la oxidación térmica que sufre el aceite durante este proceso; el mismo hecho ya fue señalado por Tewfik, así como también por Zamorano (2013) donde reportan que todas las muestras analizadas presentaron durante el calentamiento un aumento considerable de los ácidos grasos saturados, esto conlleva a la disminución del índice de yodo en las mantecas.

Además de ello, se debe tener en cuenta que el porcentaje de ácidos grasos saturados en grasas animales es elevado (42 %) y por tanto se debe tener especial cuidado al consumirlo ya que como se sabe que los ácidos grasos saturados aumentan el colesterol total, el LDL (colesterol «malo») y los triglicéridos y son responsables de la formación de placas de ateroma en las arterias. (96)

CONCLUSIONES

1.- Se determinó que la concentración de 3,4 benzopireno en las muestras dependen del tiempo de reutilización de aceites y mantecas en la fritura, esto se demostró con la prueba del Chi cuadrado ($p=0.034$) ya que en muestras usadas más de 3 días el promedio de concentración de BaP fue de 15.9669 ug/mL.

2.- Se determinó el grado de alteración de las muestras mediante la valoración de la prueba oxifrit-test, dónde se concluye que a mayor tiempo de reutilización de las muestras existe mayor grado de alteración, así lo demuestra el análisis del chi cuadrado ($p= 0.04$), donde de las muestras que estan totalmente alteradas el 85,7 % fueron usadas más de 3 días.

3.- Se determinó los parámetros fisicoquímicos, índice de yodo (media=44.7933) e índice de acidez (media=1,836%), en las muestras recolectadas y se concluye que existe relación con el grado de alteración como se demuestra al usar la prueba estadística de chi cuadrado $p = 0.004$ para el índice de acidez y $p =0.001$ para el índice de yodo.

4.- Se realizó un análisis organoleptico (color, olor y aspecto) a todas las muestras de aceites y mantecas térmicamente degradados, determinándose su influencia con el grado de alteración.

5.- En el presente trabajo se optimizó la técnica de extracción líquido-líquido para cuantificación de 3,4 benzopireno por adición de estándar en cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), con detector DAD. Adecuando las siguientes condiciones de extracción: Temperatura de saponificación: 60° c, Tiempo de centrifuga: 10 minutos, Velocidad de centrifuga: 4000 rpm, Temperatura de rotavapor: 40 °C, Velocidad de rotavapor: 20 rpm.

6.- Se evaluó las concentraciones de 3,4 benzopireno por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en la totalidad de muestras de

mantecas y aceites alterados por su constante reutilización, obteniendo un promedio en chicharronerías de 12.699 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y pollerías con un promedio de 10.5135 $\mu\text{g}/\text{kg}$, ambos resultados sobrepasan el límite establecido por los países europeos que es de 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y en un 65% superan los límites establecidos por China (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

SUGERENCIAS

- A la DIGESA: se requiere contar con una legislación o al menos, que el país se una a la normativa propuesta por la Comisión Europea. También, sería importante contar con investigaciones peruanas, en las que se cuantifiquen los HAP en los alimentos y su relación con los métodos de cocción de mayor uso entre la población; con el fin de ejercer, dentro de lo posible, un mayor control en la formación y la ingesta, buscando prevenir la aparición de cáncer de diferente localización.
- A la Municipalidad: realizar inspecciones más constantes a estos establecimientos, usando pruebas de detección rápidas como el oxifrit-test. Así como también se sugiere brindar apoyo a los tesisistas que quieran contribuir con proyectos relacionados con el servicio a la comunidad.
- A los comerciantes: La disponibilidad para recibir las recomendaciones que se les otorgue para la mejora del servicio.
- A la Universidad: La implementación de un laboratorio de control de calidad de alimentos para la Carrera Profesional de Farmacia y Bioquímica.
- A los docentes: Incentivar y participar en la elaboración de proyectos relacionados con la salud pública y de esa manera elevar el nivel de participación de nuestra Carrera Profesional hacia la comunidad.
- A los estudiantes: Realizar más estudios de determinación de la presencia de 3,4-benzopireno y otros hidrocarburos aromáticos policíclicos en el humo que se desprende de los aceites y grasas utilizados durante la fritura de alimentos. Así como también evaluar la

presencia de hidrocarburos aromáticos policíclicos cancerígenos, entre ellos al benzo(a)pireno en alimentos braseados, ahumados y a la parrilla.

BIBLIOGRAFIA

1. Dobarganes, M., Marquez-Ruíz, G. Control de calidad de las grasas de fritura. Validez de los métodos de ensayos rápidos en sustitución de la determinación de compuestos polares. Rev. Grasas y Aceites. 1995 ; Vol 46: 196-201.
2. Masson, L.; Robert, P., Comportamiento de aceites poliinsaturados en la preparación de patatas fritas para consumo inmediato: Formación de nuevos compuestos y comparación de métodos analíticos. Rev. Grasas y Aceites. 1997 Vol. 48(5): 273-281.
3. Jimenez, S.; Rodríguez A. Digestibilidad in vivo de la manteca de cerdo sobrecalentada. Rev. Grasas y Aceites 1986 Vol. 37 194-196.
4. Jiménez, S.; Vidaud, Z. Toxicidad subaguda de las mantecas de freidura. I. Caracterización química y evaluación de algunos indicadores clínicos y hematológicos en ratas. Rev. Grasas y Aceites 1987 Vol. 38 363-366.
5. Paul S, Mittal GS, Regulating the use of degraded oil/fat in deep-fat/oil food frying . Rev Food Science Nutrition. 1997; Nov;37(7):635-62.
6. Anelich, L; Kock, J The quality of used frying fats in South Africa, Rev South African Journal of Science 2001 ; volume: 97: 289 – 290.
7. Eroski Consumer – Salud .[Internet] España 9 de mayo 2002. Disponible en: <http://www.consumer.es/web/es/salud/2001/07/04/44492.php>.
8. Agencia Andina. Uso de aceite recalentado es altamente cancerígeno.[Internet] Perú, El Comercio ,2012 [Fecha de acceso 23 de junio 2013] Disponible en : <http://elcomercio.pe/gastronomia/peruana/uso-aceite-recalentado-altamente-cancerigeno-noticia-1357561>.

9. Agencia Andina. Uso de aceite recalentado altera tejidos y puede causar cáncer, alertan [Internet] Perú, Peru.com ,2012 [Fecha de acceso 22 de junio 2013] Disponible en: <http://peru.com/actualidad/mi-ciudad/kfc-uso-aceite-recalentado-altera-tejidos-y-puede-causar-cancer-alertan-noticia-112482>.
10. Christie, W. W. Lipid Analysis. PergamonPress , Londres, 1 ed. Headington Hill Hall 1-12.1982.
11. Gurr, M. I., & James, A. T. Lipid Biochemistry and introduction ,Rev. New York: Press Ithaca.1971.
12. Akoh, C. C., & Min, D. B. Nomenclature and Classification of Lipids.Rev. New York City, USA. 2002. Vol 29: 34
13. Badui Dergal, S. Lípidos. Química de los alimentos. 4 ed., México: Pearson Educación. 2006.
14. Mathews, C. A., van Holde, K. E., & Ahern, K. G. Bioquímica. 3° ed.. Madrid, España: Pearson Addison Wesley ;2002.
15. Lehninger, A. Principios de Bioquímica. 5 ed., Argentina: Omega.2009.
16. Thompson, J. L. Nutrición . 1 ed Madrid, España: Pearson.2008.
17. Garrido Pertierra Amando, Teijón Rivera Jose Maria. Bioquímica Estructural - 2° ed. Editorial tèbar Madrid España. 2006.
18. Wade, L. G. Química Orgánica. 5 ed. Madrid, España: Pearson. 2004.
19. MSSSI Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad "Reglamentación Técnico-Sanitaria de Aceites Vegetales Comestibles" Real Decreto 308/1983, Modificado el 2013, España: Boletín Oficial del Estado. 2013

20. Badui, S. Química de los Alimentos. 1 ed. México : Editorial Pearson Educación. 1993.
21. BDN, S.L. Aceites de Fritura. Alimentación, equipos y tecnología. [Internet] Barcelona: BDN ; 1993. [Fecha de acceso: 20 de mayo 2013] Disponible en: <http://www.bdnhome.com/> .
22. Yague M. Estudio de utilización de aceites para fritura en establecimientos de comidas preparadas.[Tesis doctoral] Bellaterra-España Universidad Autónoma de Barcelona, 2005.
23. Hidalgo, F. J. & Zamora, R.. El papel de los lípidos en el pardeamiento no enzimático. Rev. Grasas y Aceites 2000; 51 (1-2), 35-49.
24. Gil, M. La fritura de los alimentos. Rev. IFAL. 2005 (21):1-61.65.
25. Lawson, H. Aceites y Grasas Alimentarios. Tecnología, Utilización y Nutrición. 2 ed. Zaragoza: Editorial Acribia, SA.. 1999.
26. Juárez, M. D. Deterioro de aceite de soja parcialmente hidrogenado empleado en la fritura de un alimento cárnico. Rev. Grasas y Aceites 2005. Vol. 56 (1), 53-58.
27. Lercker, G., & Carrasco, A. Proceso culinario de fritura y el uso del aceite de olica en el mismo. Rev. Tesoro de Andalucía ; España. 2010.
28. Alais, C., & Linden, G. Manual de Bioquímica de los alimentos .3 ed. Barcelona, España: Masson. 1990.
29. Frankel, E.N. Lipid Oxidation. (Frankel, E.N. Ed.) Rev. The Oily Press, Dundee, Scotland. 1998.
30. Fenema O. Química de los alimentos. 2 ed. España: Editorial Acribia, SA. Zaragoza. 2000.

31. Grosch B. Manual de Química y Bioquímica de Los Alimentos. 1 ed. Zaragoza : Editorial Acribia, S.A., 1992.
32. Jean, A. Análisis sensorial de los alimentos . Barcelona, España: Acribia. 2000.
33. Stier, Richard F; Dimarco, Nancy; Blumenthal, Michael; Farr, Walter. "Guía para la aplicación del aceite de semilla de algodón". National cottonseed products association (NCPA).
34. Panreac. Métodos oficiales de análisis. Aceites y grasas. 1999.
35. Harris, D. C. Análisis Químico Cuantitativo (2 ed.). Barcelona, España: Reverté. 2001.
36. Zumbado H. Análisis químico de los alimentos: Métodos clásicos. Editorial Universitaria. Cuba. 2002.
37. Mora-Lizcano J. Efecto de la temperatura en la variación de la viscosidad de un aceite degradado por fritura en inmersión de papas. (Tesis) Universidad de Pamplona. Facultad de Ingenierías y arquitectura. Programa de Ingeniería de alimentos. 2007.
38. Walter, L.C. y Serbia, G.W. Safety aspects of frying fats and oils. Rev. Food. Technol. 1991; 45(2)84.
39. Valle P, Lucas B. Toxicología de alimentos. 2da ed. OMS. Metepec México D.F. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud. 2000.
40. Suaterna, A. La fritura de los alimentos: el aceite de fritura. Perspectivas en nutrición humana Rev. Universidad de Antioquia. Medellín. Colombia 2009; Vol. 11 No. 1.

41. Vives I, Grimalt JO, Los hidrocarburos Aromáticos policíclicos y la salud humana. Rev. Apuntes de Ciencia y Tecnología. 2001 Vol. Nº 3, p. 45-51.
42. Ryser HJ. Chemical carcinogenesis. N Engl J Med. 1971; Vol 34 .285:721
43. Food and the Agriculture Organization of the United Nations (FAO) Nutrientes esenciales- Lípidos [Internet]. Estados Unidos: FAO; fecha desconocida [Fecha de acceso 19 de mayo 2013] Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/field/003/ab492s/ab492s02.htm>.
44. Lichtfouse E, Apitz S, Nanny M. Ancient polycyclic aromatic hydrocarbons in modern soils: ¹³C, ¹⁴C and biomarker evidence. Rev. Org Geochem. 1999.
45. Vasiluk L, Pinto LJ, Tsang WS, Gobas FA, Eickhoff C, Moore MM. The uptake and metabolism of benzo[a]pyrene from a sample food substrate in an in vitro model of digestion. Food Chem Toxicol. 2008. Disponible en: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17959292.
46. Henkjan J, Verkade HJ, Tso P. Biophysics of intestinal luminal lipids. In: Mansbach CM. Intestinal lipid metabolism. Rev. New York: Kluwer Academic/Plenum; 2001. P. 1-19.
47. IARC Monographs - 100F. Evaluation of Benzo[a]pyrene [Internet]. Disponible en: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol100F/mono100F-14.pdf>.
48. Buesen R, Mock M, Nau H, Seidel A, Jacob J, Lampen A. Human intestinal Caco-2 cells display active transport of benzo[a]pyrene metabolites. Rev. Chem Biol Interact. 2003;142:201-21.

49. Cavret S, Feidt C. Intestinal metabolism of PAH: in vitro demonstration and study of its impact on PAH transfer through the intestinal epithelium. [Fecha de acceso: Mayo 2005]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15721880>.
50. Boulenc X, Bourrie M, Fabre I, Roque C, Joyeux H, Berger Y, et al. Regulation of cytochrome P450IA1 gene expression in a human intestinal cell line, Caco-2. J Pharmacol Exp Ther. [Fecha de acceso: 29 de octubre 2007]. Disponible en: <http://dmd.aspetjournals.org/content/36/2/276.full>.
51. Kaarthik J. Modulation of gene expression and DNA adduct formation by chlorophyllin in human mammary cells exposed to benzopyrenes. West Virginia: Department of Plant and Soil Science Morgantown; 2006. Disponible en: http://wvuscholar.wvu.edu:8881/exlibris/dtl/d3_1/apache_media/L2V4bGlicmlzL2R0bC9kM18xL2FwYWNoZV9tZWRpYS8yMTI2Nw==.pdf.
52. Slayne MA. Polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetable oil. Int Rev Food Sci Technol. 2003;141:136-7.
53. Quiñones L, Lee K, Varela N, Escala M, García K, Godoy L, et al. Farmacogenética del cáncer: Estudio de variaciones genéticamente determinadas en la susceptibilidad a cáncer por exposición a xenobióticos. Rev Med Chile. 2006. Vol 3.
54. Xue W, Warshawsky D. Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: a review. Toxicol Appl Pharmacol. 2005; Vol 206:73-93.
55. Wei Y, Lin Y, Zhang AQ, Guo LH, Cao J. Evaluation of the noncovalent binding interactions between polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites and human p53 cDNA. Rev. Sci Total Environ. 2010;Vol. 408:6285-90.

56. Tarantini A, Maitre A, Lefebvre E, Marques M, Rajhi A, Douki T. Polycyclic aromatic hydrocarbons in binary mixtures modulate the efficiency of benzo[a]pyrene to form DNA adducts in human cells. Rev. Elsevier Ireland 2010.
57. Gao M, Li Y, Sun Y, Long J, Kong Y, Yang S, et al. A common carcinogen benzo(a)pyrene causes p53 overexpression in mouse cervix via DNA damage. Rev. Mutat Res. 2011;724:69-75.
58. Mastrangelo G, Fadda E, Marzia V. Polycyclic aromatic hydrocarbons and cancer in man. Rev. Environ Health Perspect. 1996 Nov; Vol. 104:1166-70.
59. Osborne MR, Crosby NT. Benzopyrenes: Cambridge monographs on cancer research. Boston: Cambridge University Press; 1987. P. 352.
60. Denissenko MF, Pao A, Tang M, Pfeifer GP. Preferential formation of benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53. Rev. Science. 1996; Vol 274:430-2.
61. Shemer H, Linden KG. DNA methylation analysis using CpG microarrays is impaired in benzopyrene exposed cells. Rev. Water Res. 2007; Vol 41:853-61.
62. Helleberg H, Tornqvist M. A new approach for measuring protein adducts from benzo[a]pyrene dilepoxide by high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom. 2000; Vol. 14:1644-53.
63. Sugihara N, James MO. Binding of 3-hydroxybenzo[a]pyrene to bovine hemoglobin and albumin. Rev. J Biochem Mol Toxicol. 2003; Vol 17: 239-47.

64. Behrend L, Henderson G, Zwacka RM. Reactive oxygen species in oncogenic transformation. *Rev. Biochem Soc Trans.* 2003;Vol. 31:1441
65. Gower JD, Wills ED. The oxidation of benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol mediated by lipid peroxidation in the rat intestine and the effect of dietary lipids. *Rev. Chem Biol Interact.* 1987;63:63-74.
66. Neal MS, Zhu J, Holloway AC, Foster WG. Follicle growth is inhibited by benzo-[a]-pyrene, at concentrations representative of human exposure, in an isolated rat follicle culture assay. *Rev. Hum Reprod.* 2007;22:961-7.
67. Jurisicova A, Taniuchi A, Li H, Shang Y, Antenos M, Detmar J, et al. Maternal exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons diminishes murine ovarian reserve via induction of Harakiri. *J Clin Invest.* 2007; 117:3971.
68. Tsai-Turton M, Nakamura BN, Luderer U. Induction of apoptosis by 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene in cultured preovulatory rat follicles is preceded by a rise in reactive oxygen species and is prevented by glutathione. *Biol Reprod.* 2007;77:442-51.
69. Smith TL, Merry ST, Harris DL, Joe Ford J, Ike J, Archibong AE, et al. Species-specific testicular and hepatic microsomal metabolism of benzo(a)pyrene, an ubiquitous toxicant and endocrine disruptor. *Rev. Toxicol In Vitro.* 2007;21:753-8.
70. Harris DL, Huderson AC, Niaz MS, Ford JJ, Archibong AE, Ramesh A. Comparative metabolism of benzo(a)pyrene by ovarian microsomes of various species. *Environ Toxicol.* 2009;24:603-9.
71. Wester PW, Muller JJ, Slob W, Mohn GR, Dortant PM, Kroese ED. Carcinogenic activity of benzo[a]pyrene in a 2 year oral study in Wistar rats. *Food Chem Toxicol.* 2011;50:927-35

72. Shimada T. Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2006;21:257-76.
73. Jiang H, Gelhaus SL, Mangal D, Harvey RG, Blair IA, Penning TM. Metabolism of benzo[a]pyrene in human bronchoalveolar H358 cells using liquid chromatography-mass spectrometry. *Chem Res Toxicol.* 2007;20:1331-41.
74. Sang H, Zhang L, Li J. Anti-benzopyrene-7,8-diol-9,10-epoxide induces apoptosis via mitochondrial pathway in human bronchiolar epithelium cells independent of the mitochondria permeability transition pore. *Food Chem Toxicol.* 2012;50:2417-23
75. Compagnone D, Curini R, D'Ascenzo G, Del Carlo M, Montesano C, Napoletano S, et al. Neutral loss and precursor ion scan tandem mass spectrometry for study of activated benzopyrene-DNA adducts. *Anal Bioanal Chem.* 2011;401:1983-91.
76. Culp SJ, Gaylor DW, Sheldon WG, Goldstein LS, Beland FA. A comparison of the tumors induced by coal tar and benzo[a]pyrene in a 2-year bioassay. *Carcinogenesis.* 1998;19:117-24.
77. Tso P. Intestinal lipid absorption. In: *Physiology of the gastrointestinal tract.* New York: Raven Press; 1994. p. 867-1907.
78. Ozaki T, Nakagawara A. p53: The attractive tumor suppressor in the cancer research field. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2011:IVol 603-925.
79. Matikainen T, Perez GI, Jurisicova A, Pru JK, Schlezinger JJ, Ryu HY, et al. Aromatic hydrocarbon receptor-driven Bax gene expression is required for premature ovarian failure caused by biohazardous environmental chemicals. *Nat Genet.* 2001; 28:355-60.

80. Perera F, Vishnevetsky J, Herbstman JB, Calafat AM, Xiong W, Rauh V, et al. Prenatal bisphenol a exposure and child behavior in an inner-city cohort. *Environ Health Perspect.* 2012;120:1190-4.
81. Herbstman JB, Tang D, Zhu D, Qu L, Sjodin A, Li Z, et al. Prenatal exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons, benzo[a]pyrene-DNA adducts, and genomic DNA methylation in cord blood. *Environ Health Perspect.* 2012;Vol 120:733-8.
82. Djinojic J, Popovic A, Jira W. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in different types of smoked meat products from Serbia. *Meat Sci.* 2008;80: Vol. 449-56.
83. Comisión Europea. Regulación N° 1881/2010 por la cual se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. [citado febrero de 2013]. Disponible en: http://europa.eu/legislation_summaries/food_safety/contamination_environmental_factors/l21290_es.htm.
84. Essumang DK, Dodoo DK, Adjei JK. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) contamination in smoke-cured fish products. *Ghana J Food Comp Anal.* 2012;27. :128 -38.
85. CODEX ALIMENTARIO. Organización Mundial de la Salud. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Roma. 2012.
86. Viera J. Estabilidad del aceite de fritura de chifles (tesis). Piura: Facultad de Ingeniería Industrial – Universidad de Piura. 2005.
87. Rivera, Y; Gutiérrez, C; Gómez, R; Matute, M; Izaguirre, C. Cuantificación del deterioro de aceites vegetales usados en procesos de frituras en establecimientos ubicados en el Municipio Libertador del Estado Mérida. Laboratorio de Ciencias, Ingeniería y Biotecnología de

- Alimentos. Escuela de Ingeniería Química. Universidad de Los Andes. Mérida –Venezuela. Walter, L.C. y Serbia, G.W. Safety aspects of frying fats and oils. Rev. Food. Technol. 1991; 45(2)84.
88. Yagüe Aylón MA. 2.003. Estudio de utilización de aceites para fritura en establecimientos alimentarios de comidas preparadas. Informes Técnicos. Observatorio de la Seguridad Alimentaria.
89. Bordin K. et al. Changes in food caused by deep fat frying – A review Rev. Latinoam Nutr. 2013 Mar;63(1):5-13
90. Zamorano M., Martínez S., Medel J. Comportamiento del perfil de ácidos grasos de aceites y materias grasas hidrogenadas sometidos a calentamiento prolongado (Tesis pre-grado). Santiago :Chile; Universidad de Santiago de Chile. 2013.
91. Rodríguez J. Implementación del análisis cuantitativo de índice de yodo para aceite de palma, aceite de pescado y sebo, en la compañía industrial de productos agropecuarios (CIPA S.A) (Tesis Pre-grado). Colombia: Universidad tecnológica de Pereira. Facultad de tecnologías. 2013
92. De la Cruz E. ; Huaman J. Formación de hidrocarburos aromáticos policíclicos y del 3,4 Benzo-pireno en aceites comestibles alterados por recalentamiento. [Tesis Pre-grado] Lima- Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos Facultad Farmacia y Bioquímica. 2002
93. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente MAGRAMA [Internet] Disponible en: <http://www.magrama.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/prevencion-y-gestion-residuos/flujos/domesticos/fracciones/aceites-cocina.-201>.
94. Albarracín P., Colqui F., Di Bacco V. , González M. , Tereschuk M. Estudios de Caracterización de Aceites Usados en Frituras para ser

Utilizados en la Obtención de Jabón [Tesis Pre-grado]Argentina:
Facultad de Ciencias Exactas y Tecnología Universidad Nacional de
Tucumán. 2010

95. Navas J. Optimización y Control de la Calidad Estabilidad de Aceites y
Productos de Fritura. [Tesis doctoral] Barcelona- España . Universidad
de Barcelona. 2005

96. Lijinsky W. The formation and occurrence of polynuclear aromatic
hydrocarbons associated with food. *Mutat Res.* 1991;259:251-61

97. Tsuzuki T. Targeted disruption of the Rad51 gene leads to lethality in
embryonic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(13):6236-40

98. Tyagi V. Tyagi P, Mirabegron, a β_3 -adrenoceptor agonist for the potential
treatment of urinary frequency, urinary incontinence or urgency
associated with overactive bladder. *IDrugs* 2010; 13:713-22.

ANEXOS

ANEXO 1 : AUTORIZACION DE LA MUNICIPALIDAD



“Cusco, Patrimonio Cultural de la Humanidad” MUNICIPALIDAD PROVINCIAL DEL CUSCO

Cusco, Junio 11, 2014

CARTA N° _____ **-GDESM-MPC-2014.**

Señorita:
Jimena Quehwarucho Acuña
APV. Miguel Grau E-2
Ciudad.-

REF : **Expdte. N° 2014-015941.**

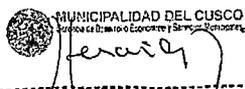
De mi mayor consideración.

Previo un cordial saludo, me dirijo a Usted., en atención al expediente de la Referencia, por el cual solicita la relación de todos los establecimientos comerciales de venta de comida y su respectiva ubicación, para un estudio de investigación en la reutilización de aceites comestibles.

Al respecto, hago de su conocimiento que la Oficina de Licencias a través de la Sub Gerencia de Comercio, Industria y Artesanía, remite la información solicitada en medio digital, la misma que se encuentra adjunta al presente, con lo que se da por atendida su petición.

Sin otro particular, me suscribo de Usted..

Atentamente,


MUNICIPALIDAD DEL CUSCO
Oficina de Comercio e Industria y Servicios Municipales
Abog. José Santos Fernández Vabar
GERENTE DE DESARROLLO ECONOMICO
Y SERVICIOS MUNICIPALES

c.c.:
Archivo

GDESM/JPV/Dap

Palacio Municipal - Plaza Cusipata - Cusco - Perú
Teléfono: (084) 227152 - Fax: (084) 226701

ANEXO 2 : FICHA DE DATOS PARA LA RECOLECCIÓN DE MUESTRAS Y ANÁLISIS CON OXIFRIT-TEST

Nombre del Establecimiento:.....**N° de muestra:**.....

Propietario:.....

Dirección del establecimiento:.....

Fecha de toma de muestra:..... **Hora:**

Tipo de aceite utilizado:

Tipo de establecimiento: Chicharronería () Pollería ()

Tiempo de uso de la muestra:

Menores a 1 día () 1 día - 3 días ()

Mayor a 3 días ()

CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS:

COLOR:

Amarillo () Pardo rojizo () Negruzco ()

Amarillo – ámbar () Pardo ()

OLOR:

Característico () Rancio ()

ASPECTO:

Líquida – oleosa. () Sólida.()

Siruposa. () Oleosa sólida ()

RESULTADO DE OXIFRIT-TEST:

Azul () Verde ()

Verde- azulado() Verde- oliva()

Observaciones:.....
.....
.....

ANEXO 3 : TABLA DE RESULTADOS DE DETERMINACION DE BENZOPIRENO POR ESPECTROSCOPIA HPLC

| N° de muestra | Hora de evaluación | Área del estándar | Área del estándar + muestra | Diferencia de Áreas |
|---------------|--------------------|-------------------|-----------------------------|---------------------|
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | Promedio: | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | Promedio: | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | Promedio: | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | Promedio: | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | Promedio: | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | Promedio: | | | |

| N° de muestra | Hora de evaluación | Área del estándar | Área del estándar + muestra | Diferencia de Áreas |
|---------------|--------------------|-------------------|-----------------------------|---------------------|
| | | | | |
| | | | | |
| | Promedio: | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | Promedio: | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | Promedio: | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | Promedio: | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | Promedio: | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | Promedio: | | | |

ANEXO 4

CONSTANCIA DE ANALISIS



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS, FÍSICAS Y MATEMÁTICAS
LABORATORIO DE CROMATOGRÁFIA Y ESPECTROMETRÍA - Pabellón de Control de Calidad
AV. De la Cultura 733 CUSCO-PERÚ Contacto: 973868955 - 944045605

CONSTANCIA DE ANÁLISIS

El que suscribe, Responsable del Laboratorio de Cromatografía de la Facultad De Ciencias Químicas, Físicas, Matemáticas, Farmacia e Informática de la Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco, deja Constancia.

Que los Bachs. Víctor Eduardo Lechuga Noa, Jimena Quehwarucho Acuña, de la Carrera Profesional de Farmacia y Bioquímica, han presentado al Laboratorio de Cromatografía 20 muestras de aceites, para su caracterización e identificación de benzopireno como parte de su proyecto de investigación titulado "Determinación de 3, 4 Benzopireno en aceites comestibles alterados usados en chicharronerías y pollerías del distrito del Cusco". Dicho material ha sido cuantificado utilizando el Cromatógrafo líquido HPLC-DAD Agilent serie 1200. La identificación se basó en la comparación de las señales con el estándar de Benzopireno.

Se expide la siguiente constancia a solicitud de los interesados para los fines que vieran por conveniente.

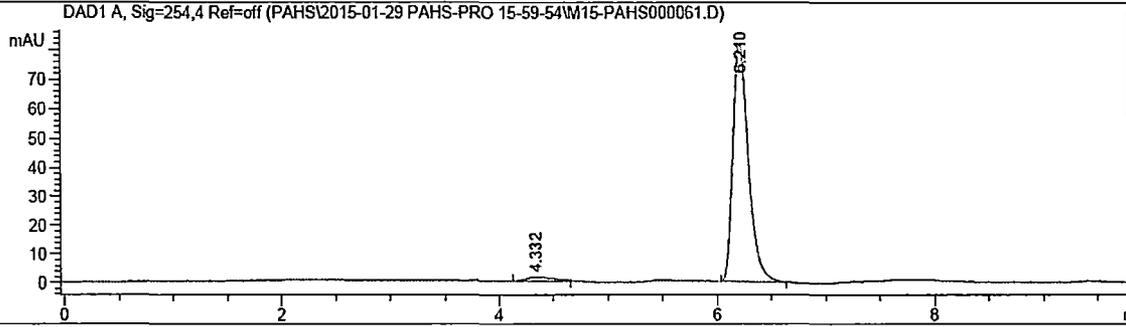
Cusco 30 de Abril del 2015



Jorge Choquenabra Paol
C.O.P. N° 914
Responsable del Laboratorio

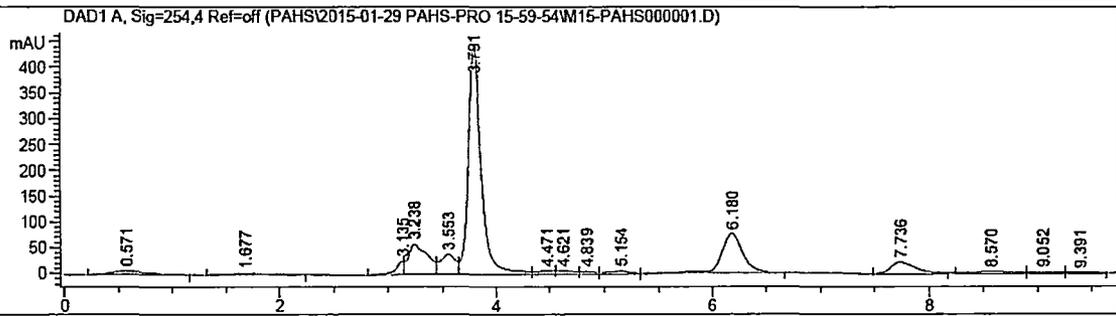
ANEXO 5 – CROMATOGRAMAS

Estándar - Chicharronerias



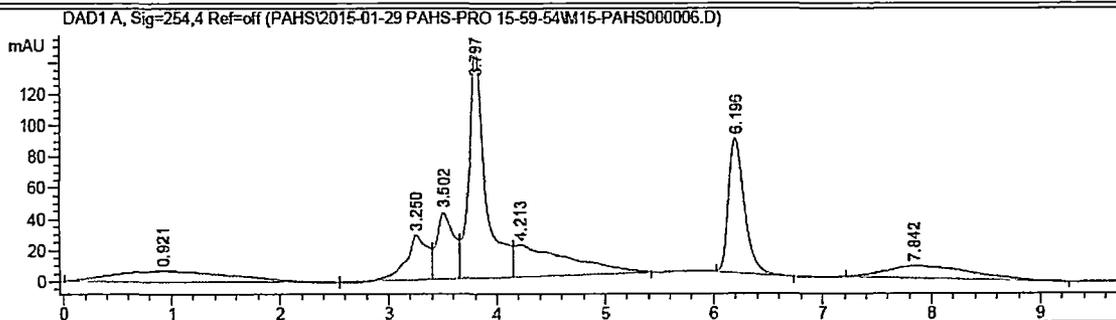
| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area [mAU*s] | Height [mAU] | Area % |
|--------|---------------|------|-------------|--------------|--------------|---------|
| 1 | 4.332 | BB | 0.2342 | 23.12179 | 1.34754 | 2.7484 |
| 2 | 6.210 | BB | 0.1526 | 818.16815 | 81.86191 | 97.2516 |

Muestra 1 – Chicharronerias



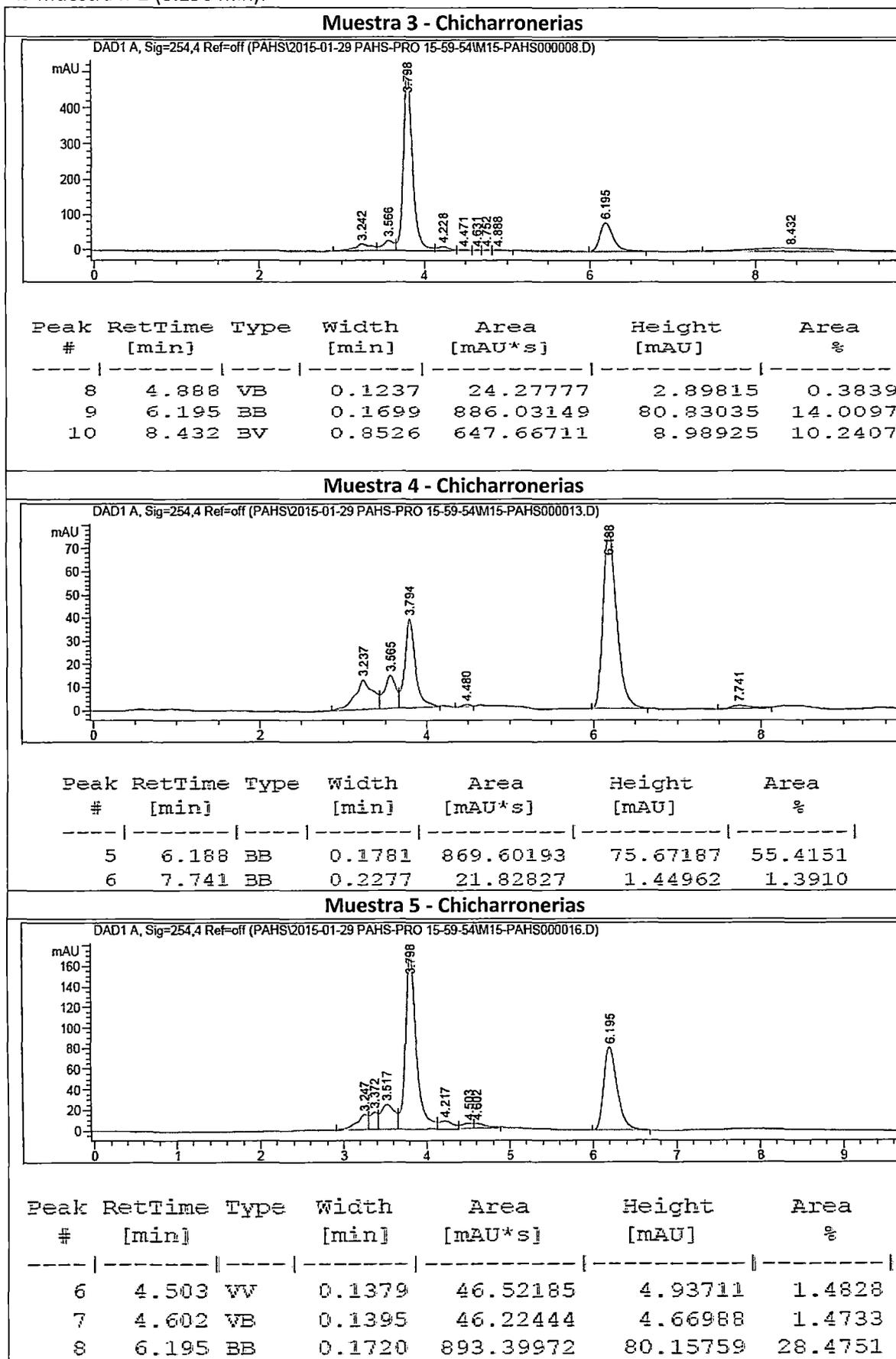
| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area [mAU*s] | Height [mAU] | Area % |
|--------|---------------|------|-------------|--------------|--------------|---------|
| 9 | 4.839 | VV | 0.1324 | 45.63288 | 4.90927 | 0.6458 |
| 10 | 5.154 | VV | 0.1770 | 75.15147 | 5.80746 | 1.0636 |
| 11 | 6.180 | VB | 0.2186 | 1106.54041 | 76.59072 | 15.6605 |

Muestra 2 – Chicharronerias



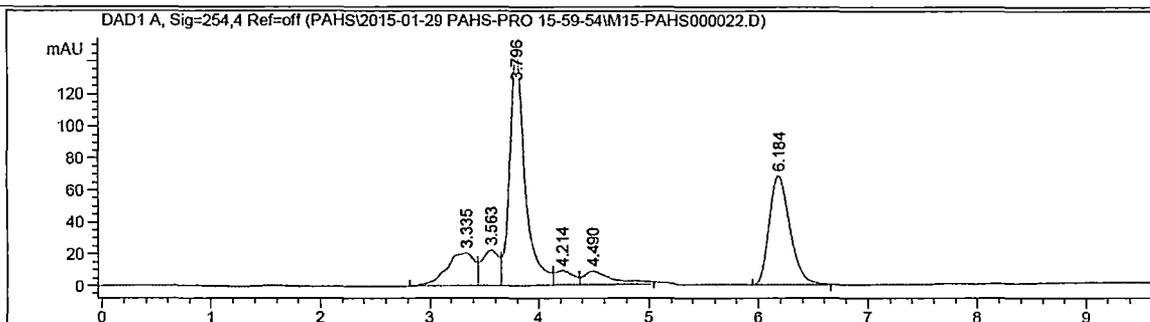
| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area [mAU*s] | Height [mAU] | Area % |
|--------|---------------|------|-------------|--------------|--------------|---------|
| 5 | 4.213 | VB | 0.4330 | 718.29535 | 20.58819 | 14.3352 |
| 6 | 6.196 | BB | 0.1571 | 879.92224 | 86.18911 | 17.5608 |
| 7 | 7.842 | BB | 0.7069 | 429.25443 | 7.69373 | 8.5667 |

Cromatogramas del estándar de benzopireno (Tr = 6.210 min), de la muestra n° 1 (6.180 min) y la muestra n°2 (6.196 min).



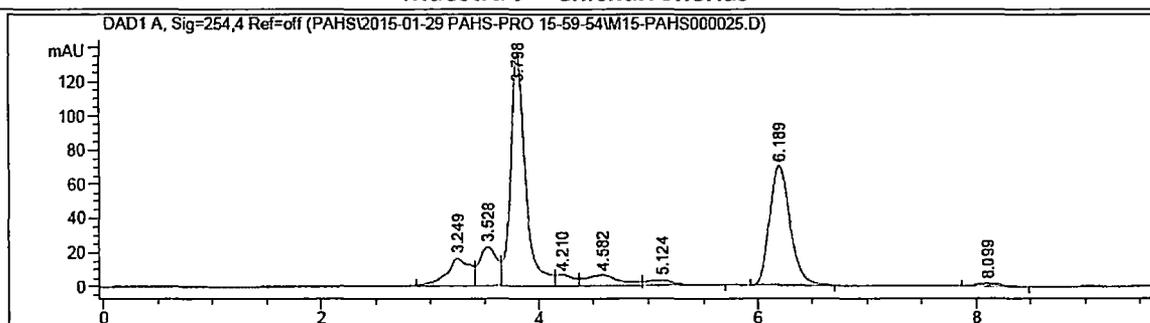
Cromatogramas de la muestra n° 3 (Tr = 6.195 min), de la muestra n° 4 (6.188 min) y la muestra n°5 (6.195 min).

Muestra 6 - Chicharronerias



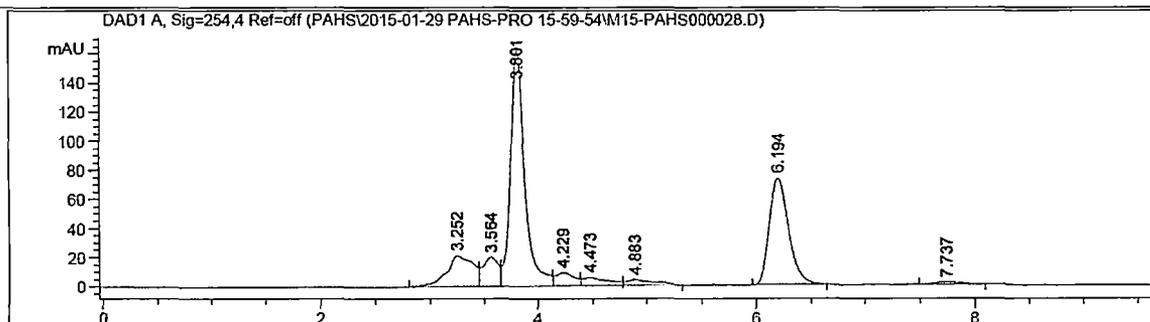
| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area [mAU*s] | Height [mAU] | Area % |
|--------|---------------|------|-------------|--------------|--------------|--------|
| 5 | 4.490 | VB | 0.2588 | 168.17897 | 8.64963 | 5.180 |
| 6 | 6.184 | BB | 0.2034 | 901.22229 | 68.52332 | 27.759 |

Muestra 7 - Chicharronerias



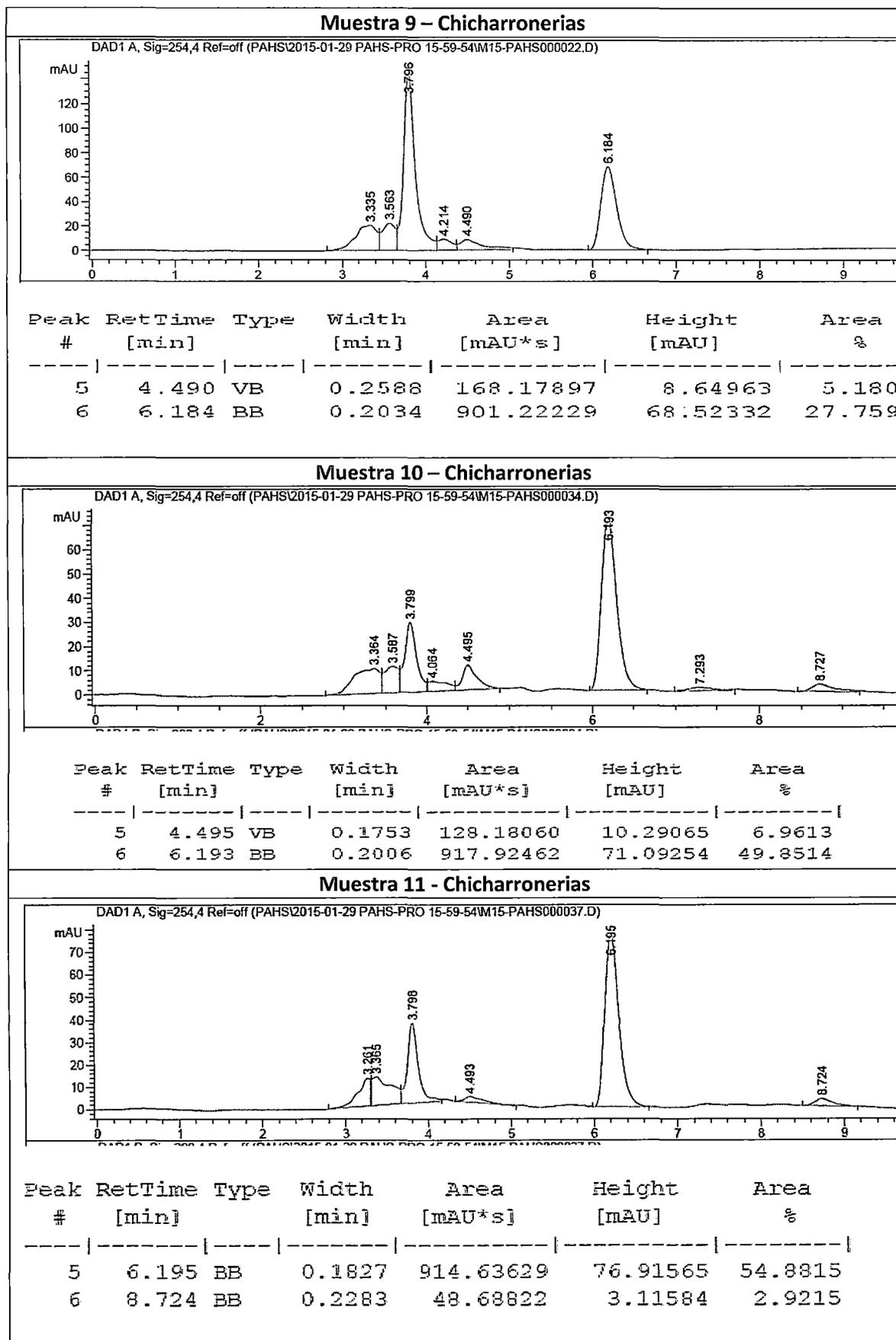
| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area [mAU*s] | Height [mAU] | Area % |
|--------|---------------|------|-------------|--------------|--------------|---------|
| 7 | 6.189 | BB | 0.2027 | 915.22906 | 69.92312 | 30.7748 |
| 8 | 8.099 | BB | 0.2280 | 20.60635 | 1.39797 | 0.6929 |

Muestra 8 - Chicharronerias

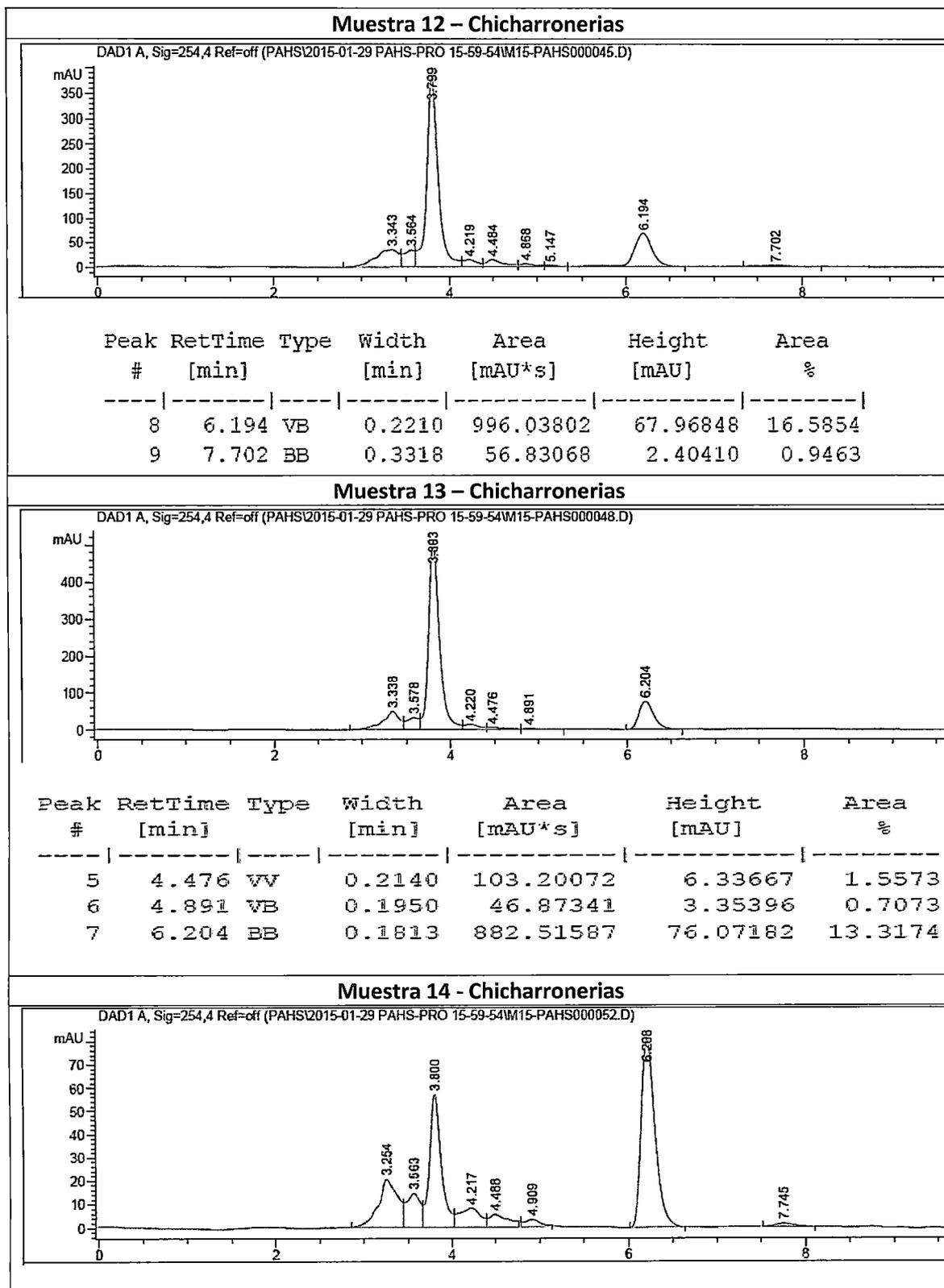


| | | | | | | |
|---|-------|----|--------|-----------|----------|---------|
| 6 | 4.883 | VB | 0.2330 | 65.73254 | 3.77841 | 2.0333 |
| 7 | 6.194 | BB | 0.1918 | 903.04657 | 73.27640 | 27.9334 |
| 8 | 7.737 | BB | 0.2380 | 25.95524 | 1.61049 | 0.8029 |

Cromatogramas de la muestra n° 6 (Tr = 6.184 min), de la muestra n° 7 (6.189 min) y la muestra n° 8 (6.194 min).

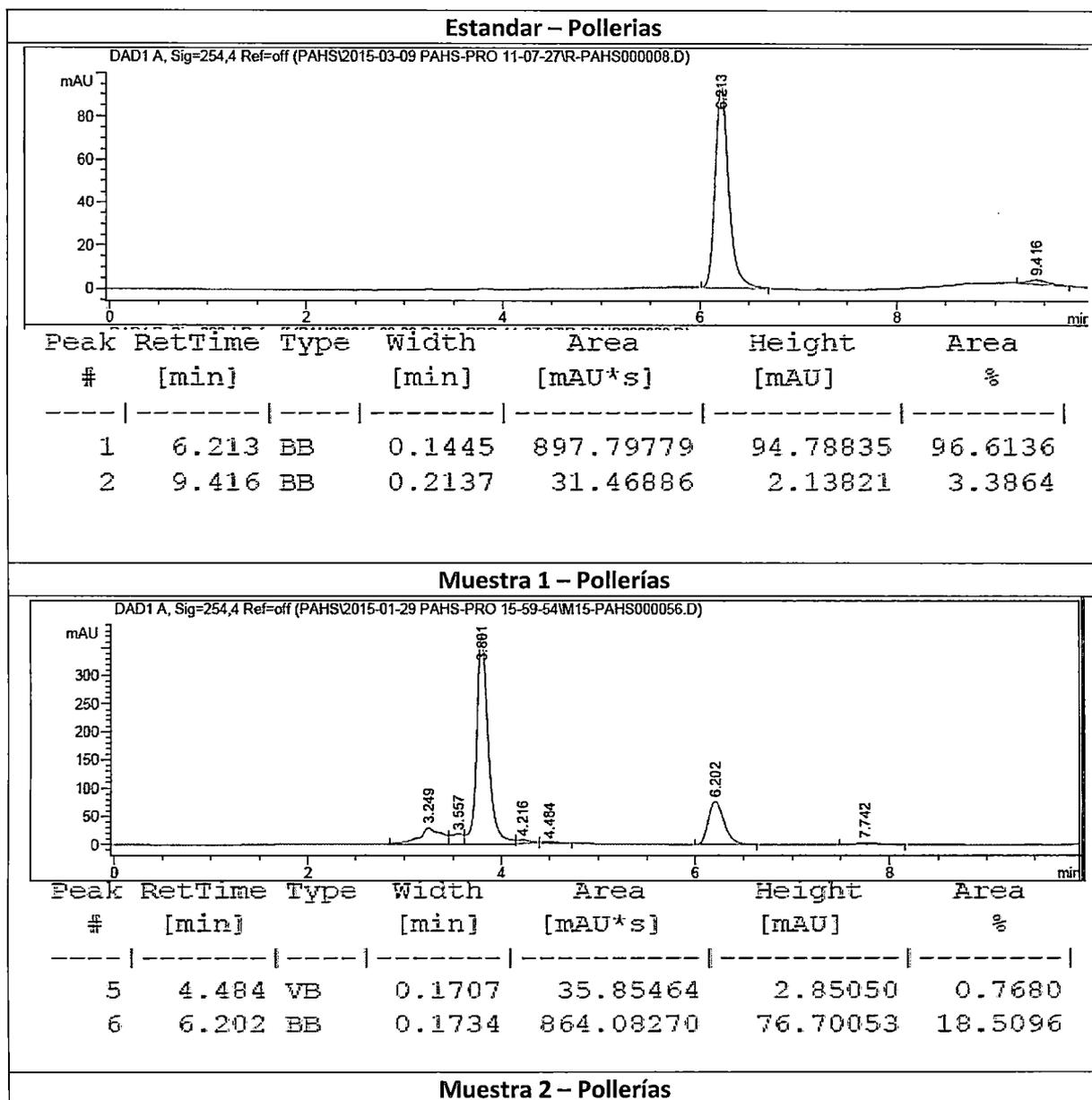


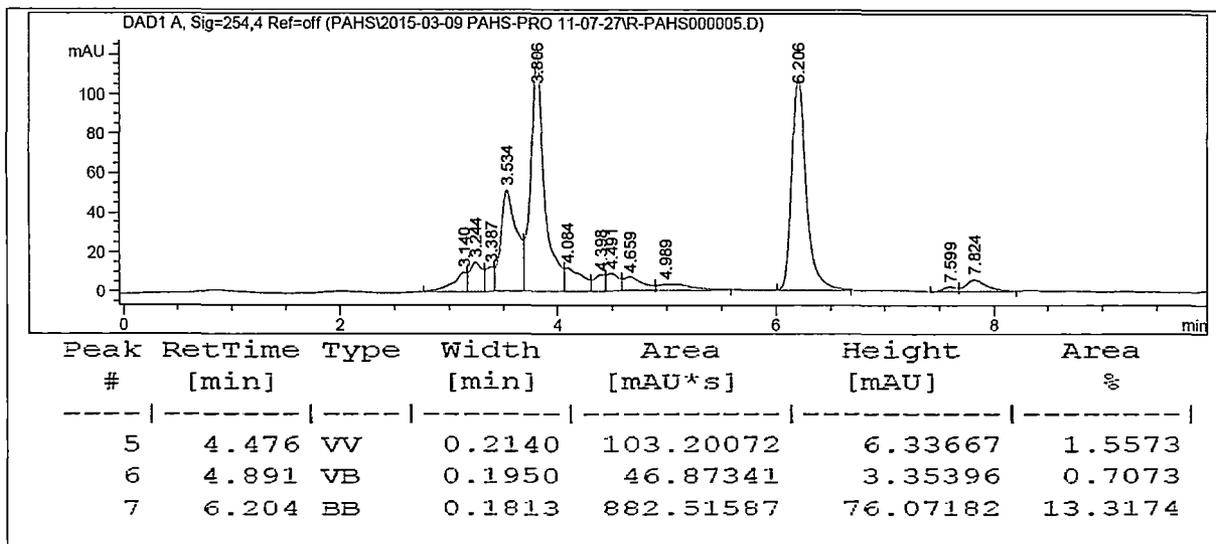
Cromatogramas de la muestra n° 9 (Tr = 6.184 min), de la muestra n° 10 (6.193 min) y la muestra n° 11 (6.195 min).



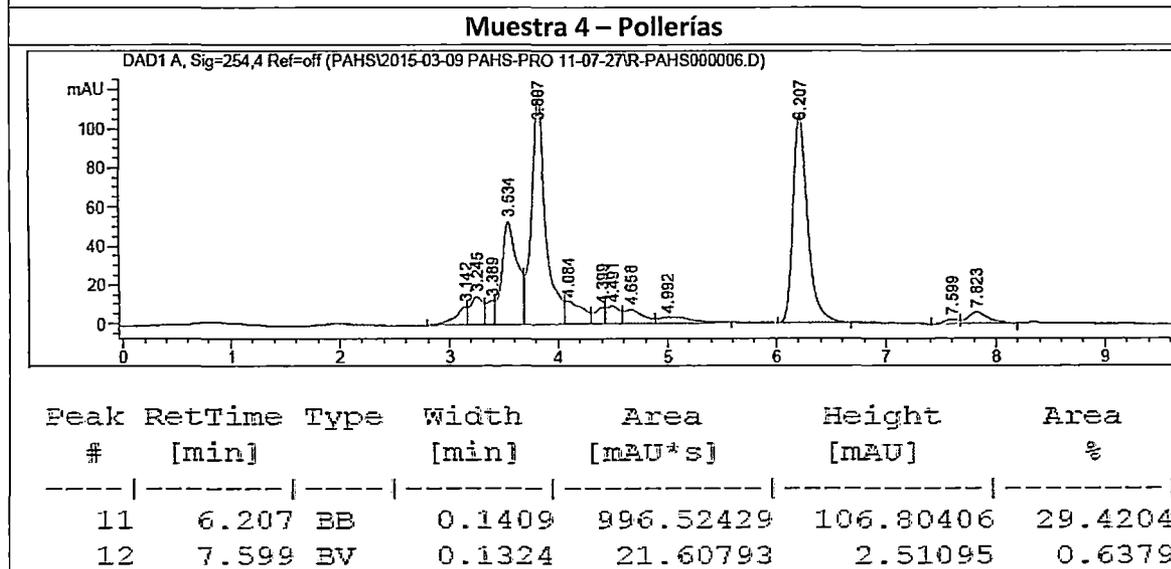
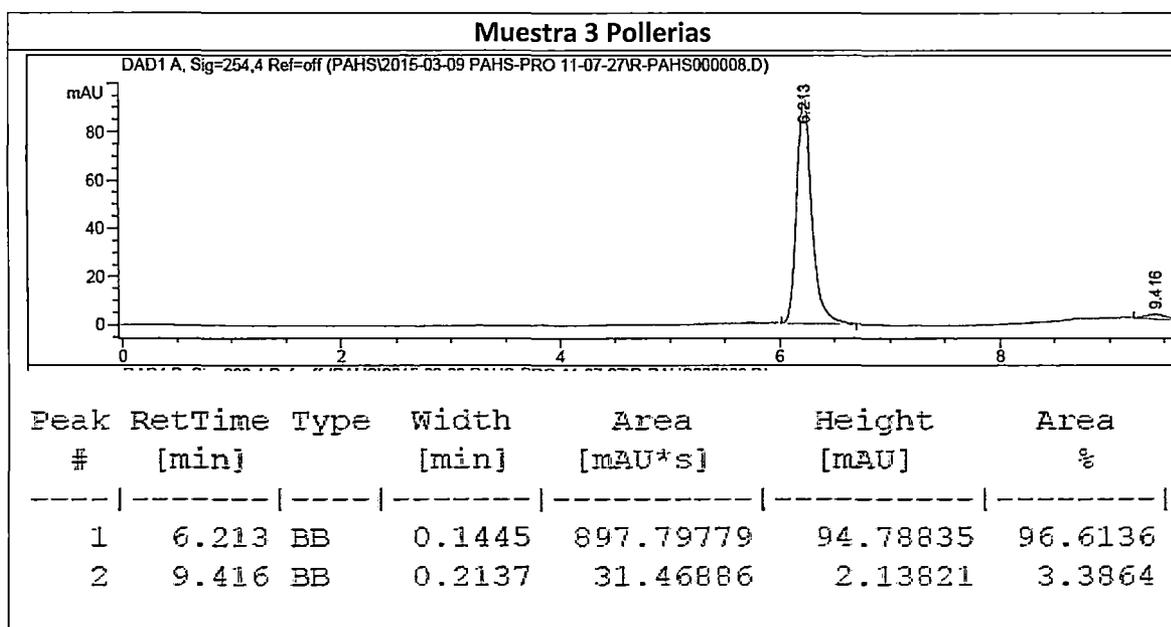
| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area [mAU*s] | Height [mAU] | Area % |
|--------|---------------|------|-------------|--------------|--------------|---------|
| 7 | 6.208 | BB | 0.1683 | 875.76361 | 80.91042 | 40.5662 |
| 8 | 7.745 | BB | 0.2299 | 21.59552 | 1.43221 | 1.0003 |

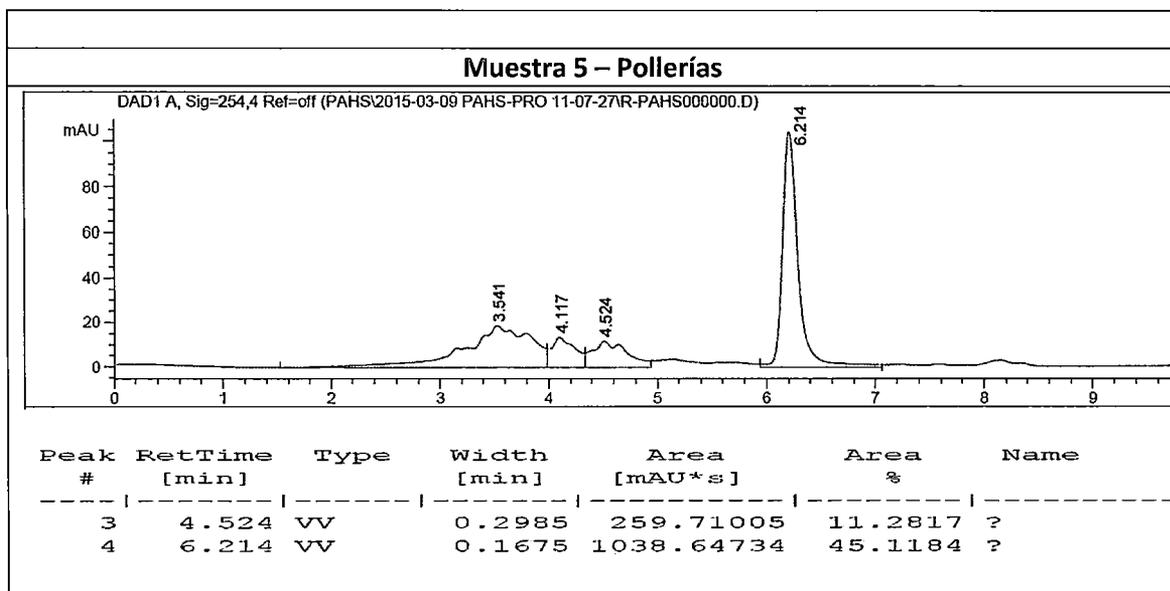
Cromatogramas de la muestra n° 12 (Tr = 6.194 min), de la muestra n° 13 (6.204 min) y la muestra n° 14 (6.208 min).



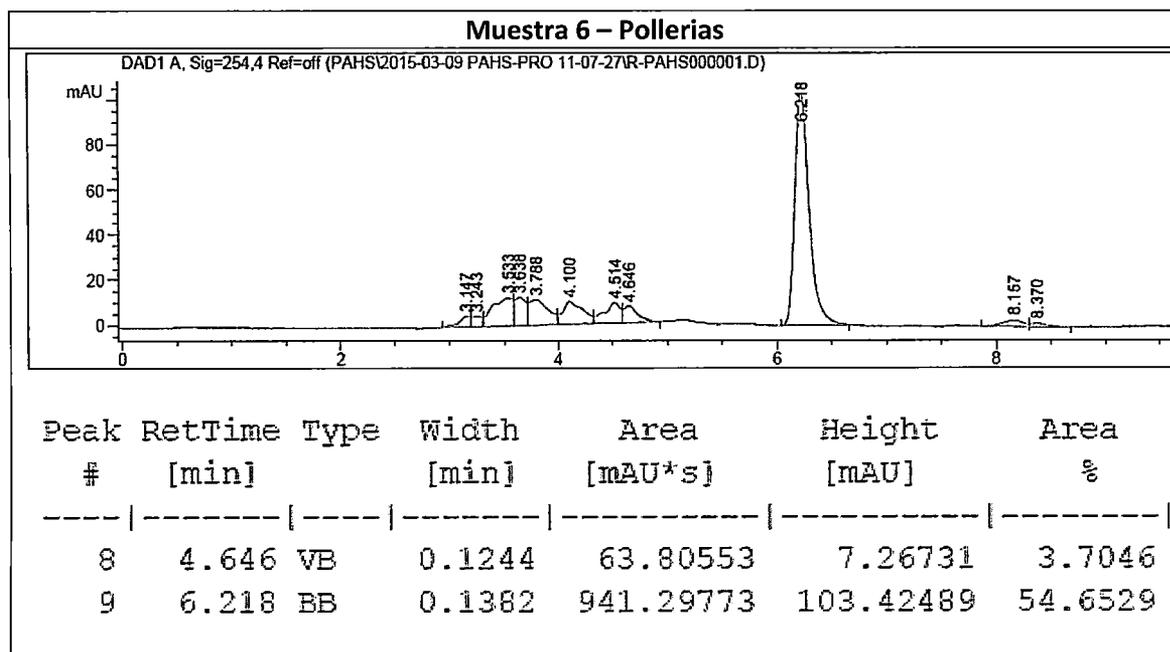


Cromatogramas del estándar de benzopireno (Tr = 6.213 min), de la muestra n° 1 (6.202 min) y la muestra n° 2 (6.204 min).}





Cromatogramas de la muestra n° 3 (Tr = 6.213 min), de la muestra n° 4 (6.207 min) y la muestra n° 14 (6.214 min).



Cromatograma de la muestra n° 6 de pollerías (Tr = 6.218 min)

ANEXO 6

RESULTADOS DE CROMATOGRAMAS.

CHICHARRONES:

| | Área de estandar + Muestra | Area de estandar | Diferencia | Concentración (ug/mL) |
|-----------------|----------------------------|------------------|-------------------|--------------------------|
| STD | 813.65405 | | | |
| | 818.16815 | | | |
| | 816.17273 | | | |
| Promedio | 815.99831 | | | |
| 1 | 948.46783 | 815.99831 | 132.46952 | 16.2340434 |
| | 1106.54041 | 815.99831 | 290.5421 | 35.6057233 |
| | 1100.13818 | 815.99831 | 284.13987 | 34.8211346 |
| Promedio | 1051.715473 | 815.99831 | 235.717163 | 28.8869671 |
| 2 | 1052.26318 | 815.99831 | 236.26487 | 28.9540882 |
| | 1069.00024 | 815.99831 | 253.00193 | 31.0052027 |
| | 879.92224 | 815.99831 | 63.92393 | 7.83383118 |
| Promedio | 1000.39522 | 815.99831 | 184.39691 | 22.5977073 |
| 3 | 886.03149 | 815.99831 | 70.03318 | 8.58251532 |
| | 865.46545 | 815.99831 | 49.46714 | 6.06216207 |
| | 907.49654 | 815.99831 | 91.4982318 | 11.2130418 |
| Promedio | 886.3311606 | 815.99831 | 70.3328506 | 8.61923974 |
| 4 | 880.38751 | 815.99831 | 64.3892 | 8.66535694 |
| | 869.60193 | 815.99831 | 53.60362 | 6.56908468 |
| | 897.41934 | 815.99831 | 81.4210272 | 9.97808772 |
| Promedio | 882.4695924 | 815.99831 | 66.4712824 | 8.40417645 |
| 5 | 893.39972 | 815.99831 | 77.40141 | 9.48548656 |
| | 877.64777 | 815.99831 | 61.64946 | 7.55509653 |
| | 877.57239 | 815.99831 | 61.57408 | 7.54585877 |
| Promedio | 882.8732933 | 815.99831 | 66.8749833 | 8.19548062 |
| 6 | 900.67719 | 815.99831 | 84.67888 | 10.3773352 |
| | 896.64801 | 815.99831 | 80.6497 | 9.88356214 |
| | 901.22229 | 815.99831 | 85.22398 | 10.4441368 |

| | | | | |
|-----------------|--------------------|------------------|-------------------|--------------------|
| Promedio | 899.51583 | 815.99831 | 83.51752 | 10.2350114 |
| 7 | 913.43439 | 815.99831 | 97.43608 | 11.9407208 |
| | 907.06908 | 815.99831 | 91.0707668 | 11.1606563 |
| | 907.01513 | 815.99831 | 91.0168154 | 11.1540446 |
| Promedio | 909.1728641 | 815.99831 | 93.1745541 | 11.4184739 |
| 8 | 903.04657 | 815.99831 | 87.04826 | 10.667701 |
| | 900.81708 | 815.99831 | 84.81877 | 10.3944786 |
| | 903.18365 | 815.99831 | 87.18534 | 10.6845001 |
| Promedio | 902.3491 | 815.99831 | 86.35079 | 10.5822266 |
| 9 | 912.73346 | 815.99831 | 96.73515 | 11.8548223 |
| | 920.85474 | 815.99831 | 104.85643 | 12.8500793 |
| | 917.92462 | 815.99831 | 101.92631 | 12.4909952 |
| Promedio | 917.17094 | 815.99831 | 101.17263 | 12.3986323 |
| 10 | 915.2320032 | 815.99831 | 99.2336932 | 12.161017 |
| | 914.63629 | 815.99831 | 98.63798 | 12.0880128 |
| | 917.8173563 | 815.99831 | 101.819046 | 12.4778501 |
| Promedio | 915.8952165 | 815.99831 | 99.8969065 | 12.24229331 |
| 11 | 900.0900846 | 815.99831 | 84.0917746 | 10.3053859 |
| | 884.2019 | 815.99831 | 68.20359 | 10.3583004 |
| | 884.31409 | 815.99831 | 68.31578 | 10.3720492 |
| Promedio | 889.5353582 | 815.99831 | 73.5370482 | 10.3452452 |
| 12 | 901.95111 | 815.99831 | 85.9528 | 10.5334532 |
| | 996.03802 | 815.99831 | 180.03971 | 22.0637356 |
| | 1019.47894 | 815.99831 | 203.48063 | 24.9364034 |
| Promedio | 972.4893567 | 815.99831 | 156.491047 | 19.1778641 |
| 13 | 882.51587 | 815.99831 | 66.51756 | 8.15167865 |
| | 884.46997 | 815.99831 | 68.47166 | 8.39115218 |
| | 881.41718 | 815.99831 | 65.41887 | 8.01703499 |
| Promedio | 882.8010067 | 815.99831 | 66.8026967 | 8.18662194 |
| 14 | 875.76361 | 815.99831 | 59.7653 | 7.32419409 |
| | 895.33905 | 815.99831 | 79.34074 | 9.72315004 |
| | 886.23071 | 815.99831 | 70.2324 | 8.60692959 |
| Promedio | 885.77779 | 815.99831 | 69.77948 | 8.55142457 |

POLLERIAS:

| | Área de estandar + Muestra | Area de estandar | Diferencia | Concentración (ug/mL) |
|-----------------|----------------------------|-------------------|-------------------|--------------------------|
| STD | 897.79779 | | | |
| | 914.49066 | | | |
| Promedio | 906.144225 | 906.144225 | | |
| 1 | 922.6757267 | 906.144225 | 106.677417 | 13.07323991 |
| | 923.2833035 | 906.144225 | 107.284993 | 13.147698 |
| | 921.0689044 | 906.144225 | 105.070594 | 12.876325 |
| Promedio | 922.3426449 | 906.144225 | 106.344335 | 13.03242097 |
| 2 | 997.2334972 | 906.144225 | 91.0892722 | 10.05240332 |
| | 998.07849 | 906.144225 | 91.934265 | 10.14565479 |
| | 996.52429 | 906.144225 | 90.380065 | 9.974136843 |
| Promedio | 997.2787591 | 906.144225 | 91.1345341 | 10.05739832 |
| 3 | 984.2786865 | 906.144225 | 78.1344615 | 8.62274011 |
| | 980.9583013 | 906.144225 | 74.8140763 | 8.25631 |
| | 977.6059372 | 906.144225 | 71.4617122 | 7.88635078 |
| Promedio | 980.9476417 | 906.144225 | 74.8034167 | 8.255133630 |
| 4 | 982.0070654 | 906.144225 | 75.8628404 | 8.372049202 |
| | 992.0964136 | 906.144225 | 85.9521886 | 9.485486557 |
| | 976.8119713 | 906.144225 | 70.6677463 | 7.79873053 |
| Promedio | 983.6384834 | 906.144225 | 77.4942584 | 8.552088763 |

| | | | | |
|-----------------|--------------------|-------------------|-------------------|--------------------|
| 5 | 1022.550747 | 906.144225 | 116.406522 | 12.846357 |
| | 1018.92638 | 906.144225 | 112.782155 | 12.4463802 |
| | 1022.586315 | 906.144225 | 116.44209 | 12.85028221 |
| Promedio | 1021.354481 | 906.144225 | 115.210256 | 12.7143398 |
| 6 | 1001.129561 | 906.144225 | 94.985336 | 10.482364 |
| | 993.1157855 | 906.144225 | 86.9715605 | 9.5979821 |
| | 1008.840932 | 906.144225 | 102.696707 | 11.33337326 |
| Promedio | 1001.02876 | 906.144225 | 94.8845346 | 10.47123979 |

ANEXO 7

FOTOGRAFIAS

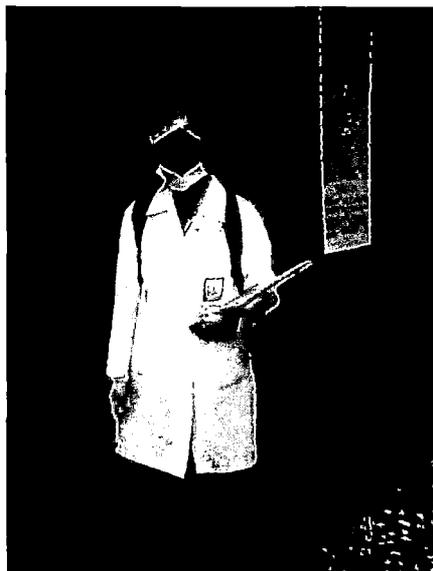


Ilustración 1: Inspección de establecimientos ubicados en la calle Pampa del Castillo. La tesista (Jimena Quehwarucho) Portando en sus manos la ficha de recolección de datos.



Ilustración 2: Recolección de 200 ml de muestras de aceite y/o grasas usadas en frasco ambar



Ilustración 3: Inspección del color, olor y consistencia de las muestras a recolectar.



Ilustración 4: Empleo del kit Oxifrit-test en aceites y/o grasas calientes para medir el grado de alteración.

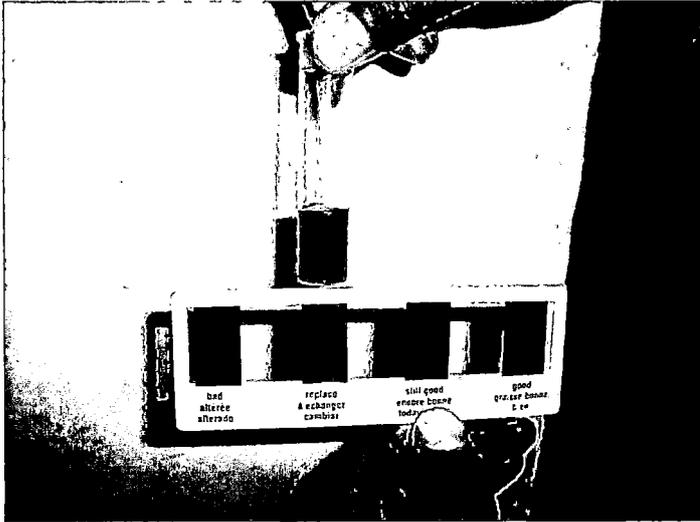


Ilustración 5: Resultados del Oxifrit-test. Aceite viró a color verde, por tanto el aceite se “Necesita cambiar”.



Ilustración 6: Muestras recolectadas de aceites y mantecas en frascos ámbar, debidamente rotulados.



Ilustración 7: Reactivos usados para el Índice de Yodo

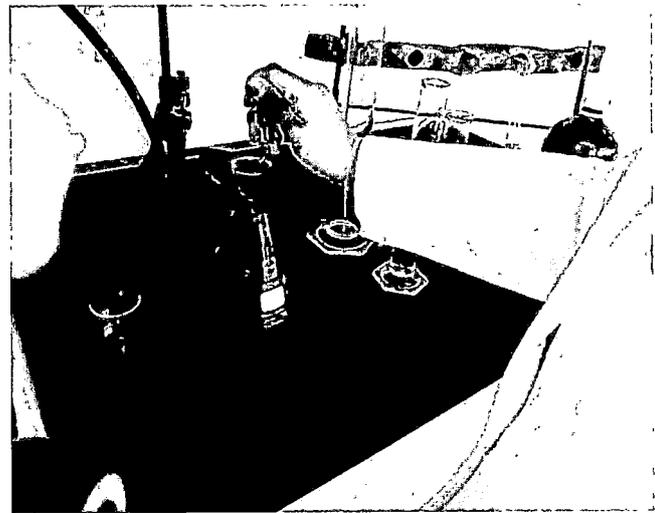


Ilustración 8: Preparación del reactivo de Wijs.



Ilustración 9: Titulación de muestras con Tiosulfato de Sodio

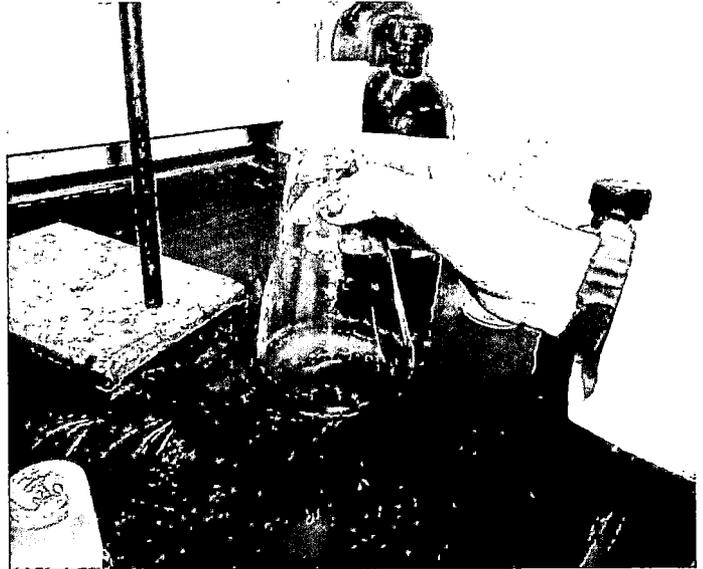


Ilustración 10: Viraje de las muestras tras titulación por el Método de Wijs.



Ilustración 10: Titulación de muestras con hidróxido de sodio 0,01M



Ilustración 11: Viraje de las muestras a color rosa tras titulación (Índice de Acidez.)



Ilustración 12: Centrifugado de muestras para lectura por HPLC.

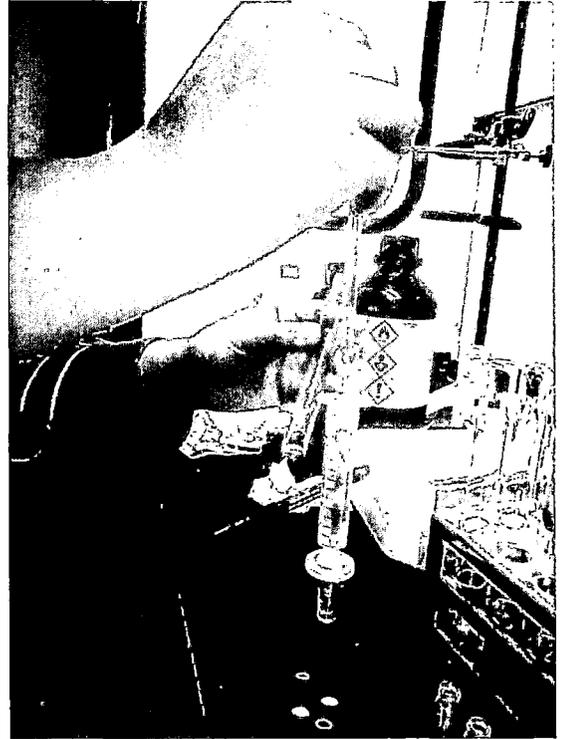


Ilustración 13: Filtrado de muestras con membrana Econofilter

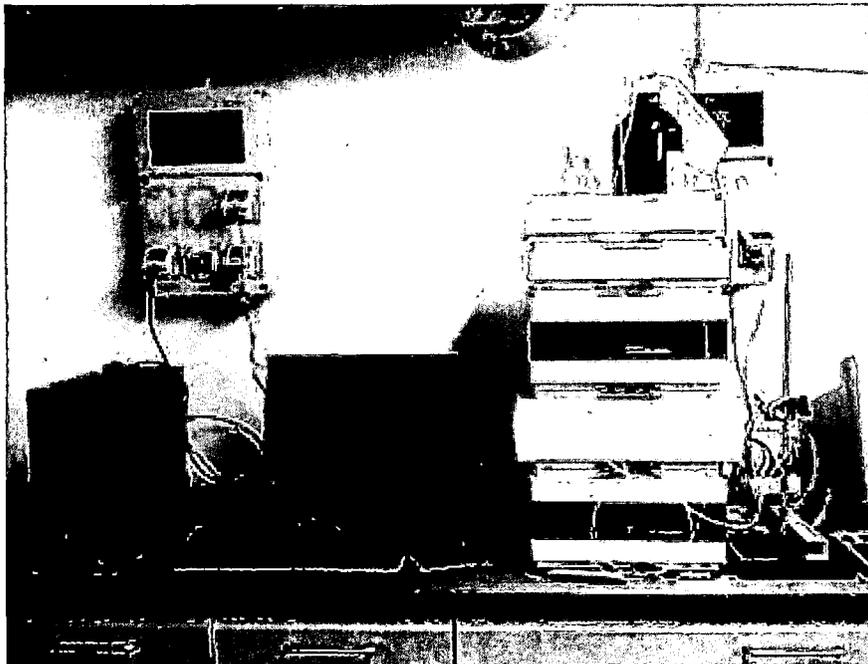


Ilustración 14: Lectura de las muestras en HPLC Agilent 1200