



Determinación del índice de peróxidos en grasas comestibles

Apellidos, nombre	Fuentes López, Ana (anfuelo@upvnet.upv.es) Fuentes López, Cristina (crifuelp@upvnet.upv.es)
Departamento	Departamento de Tecnología de Alimentos
Centro	Universitat Politècnica de València



1 Resumen de las ideas clave

Las grasas comestibles son propensas a las reacciones de deterioro que provocan cambios importantes en su composición y propiedades organolépticas. Este deterioro en la calidad de las grasas es el resultado de reacciones de lipólisis o enranciamiento hidrolítico y de reacciones de oxidación, fenómeno conocido como enranciamiento oxidativo o autooxidación. La autooxidación es un proceso irreversible provocado por una serie de reacciones en cadena. En la primera fase de este proceso se forman radicales peróxido e hidroperóxido que son muy inestables y tienden a reaccionar rápidamente dando lugar a las siguientes fases de la oxidación. Para medir el grado de oxidación de una grasa o aceite en las primeras etapas del proceso se emplea el índice de peróxidos.

2 Objetivos

Este artículo tiene como objetivo que el estudiante sea capaz de:

- Reconocer los diferentes tipos de fenómenos de enranciamiento que se producen en las grasas comestibles.
- Llevar a cabo el procedimiento de análisis para determinar la concentración de hidroperóxidos en una grasa comestible empleando el índice de peróxidos.
- Estimar el grado de oxidación primaria de un aceite comestible a partir de su valor del índice de peróxidos.

3 Introducción

El Código Alimentario Español (CAE) define como **grasas comestibles** “los productos de origen animal o vegetal cuyos constituyentes principales son glicéridos naturales de los ácidos grasos, conteniendo como componentes menores otros lípidos”. Dentro de este grupo de alimentos, se aplica “la denominación genérica de **aceites** a aquellos productos grasos líquidos a la temperatura de 20 grados centígrados, y la de **sebos y mantecas, o simplemente grasas**, a los productos grasos sólidos a la misma temperatura”.

Durante el procesado y almacenamiento de las grasas, pueden producirse una serie de reacciones de deterioro que provocan cambios importantes en su composición y propiedades organolépticas. Estos cambios tienen un impacto negativo sobre su calidad e inocuidad y provocan una reducción significativa de su vida útil. Estas alteraciones reciben comúnmente el nombre de rancidez o enranciamiento, y son el resultado de reacciones de lipólisis y de oxidación.

El **enranciamiento oxidativo**, también conocido como **autooxidación**, se debe a la oxidación de los dobles enlaces de los ácidos grasos insaturados, dando lugar a la formación de peróxidos o hidroperóxidos, que posteriormente se polimerizan y descomponen formando aldehídos,

cetonas y ácidos de menor peso molecular. La autooxidación es un proceso irreversible mediado por radicales libres a través de una serie de reacciones en cadena. Aunque es imposible detener estas reacciones y, por tanto, evitar la oxidación en su totalidad, sí pueden ser retardadas gracias a la adición de compuestos antioxidantes.

El mecanismo de oxidación consta de tres fases: iniciación, propagación y final. Los hidroperóxidos son los compuestos más importantes en la fase inicial de la reacción y se caracterizan por ser muy inestables. Al aumentar el tiempo de la reacción, estos productos primarios de la oxidación se descomponen generando una mezcla compleja de productos volátiles, no-volátiles y otros compuestos secundarios de la oxidación, cuya concentración va aumentando a medida que avanza el proceso de oxidación.

Para determinar el grado de oxidación de una grasa o alimento se pueden emplear diferentes métodos de análisis. Entre los procedimientos más utilizados para medir el nivel de oxidación de una grasa destacan el índice de peróxidos, para determinar el grado de oxidación primaria, y el índice de *p*-anisidina y el test del ácido tiobarbitúrico o índice del TBA para evaluar estados de la oxidación de las grasas más avanzados.

El índice de peróxidos permite medir el grado de oxidación únicamente en las primeras etapas de oxidación, ya que este índice mide un producto transitorio, de forma que después de su formación, peróxidos e hidroperóxidos se transforman rápidamente en otros productos de la oxidación. Es por ello que durante el tiempo de almacenamiento el valor del índice de peróxidos irá en aumento hasta alcanzar un máximo y luego comenzará a disminuir. Aunque el índice de peróxidos es uno de los procedimientos analíticos más empleados para medir estados iniciales de la oxidación, presenta también ciertas limitaciones. Entre estas limitaciones destacan su baja reproducibilidad, debido a que los resultados pueden verse afectados por condiciones ambientales como variaciones de la temperatura o exposición a la luz. Además, este método no es adecuado para determinar el grado de oxidación de las grasas con alto grado de insaturación, ya que los peróxidos formados reaccionan con los ácidos grasos insaturados dando lugar a otros productos secundarios, lo que tiene como resultado valores bajos del índice de peróxidos a pesar de que la grasa se encuentre en un estado avanzado de oxidación.

4 Desarrollo

A continuación, describiremos cómo se lleva a cabo el procedimiento de análisis para establecer el grado de oxidación primaria de una grasa comestible. Para ello, en primer lugar, se detallará el protocolo analítico que es empleado habitualmente para determinar el índice de peróxidos basado en el método descrito por la AOAC (1997). A continuación, veremos un ejemplo práctico dónde calcularemos el valor de este índice en una muestra de aceite de oliva.

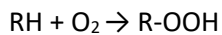
4.1 Fundamento

El índice de peróxidos se define como los miliequivalentes (mEq) de peróxido por kilogramo de muestra. Este análisis se fundamenta en la capacidad que tiene el oxígeno activo de oxidar

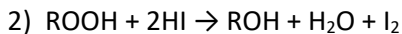
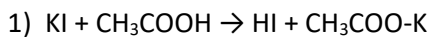


el yoduro potásico y liberar yodo, que se valora con tiosulfato empleando una disolución de almidón como indicador.

I. Generación de los hidroperóxidos



II. Generación de yodo molecular



III. Valoración



La determinación del índice de peróxidos parte de la suposición de que los compuestos que reaccionan en las condiciones de la prueba son peróxidos o productos similares de lípidos oxidados, y su análisis tiene lugar por volumetría de oxidación-reducción. Este índice mide el grado de oxidación primaria de una grasa y puede ser empleado para establecer el estado de conservación de la misma.

4.2 Materiales y reactivos

Material e instrumentación:

- Balanza analítica.
- Placa calefactora con agitación.
- Varillas magnéticas para agitación.
- Matraz Erlenmeyer de 250 mL con tapón de vidrio.
- Pipetas y micropipetas.
- Probeta graduada de 50 mL.

Reactivos químicos:

- Ácido acético glacial (CH_3COOH) para análisis, exento de oxígeno por borboteo de una corriente de gas inerte puro y seco.
- 1-Decanol ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{OH}$) para análisis.
- Yoduro potásico (KI).
- Tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) para análisis.
- Almidón soluble.

4.3 Preparación de los reactivos de análisis

1. Disolución ácido acético:1-decanol relación 3:2. Mezclar 3 volúmenes de CH_3COOH con 2 volúmenes de $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{OH}$.

2. Disolución acuosa de almidón soluble al 1%. Pesar 1 g de almidón y mezclar con 5 mL de agua destilada. A continuación, añadir 100 mL de agua destilada en ebullición y mantener en

agitación constante y ebullición durante 3 min. Pasado este tiempo, retirar de la fuente de calor y dejar atemperar.

3. Disolución saturada de yoduro potásico. Disolver 13 g de KI en 10 mL de agua destilada recientemente hervida durante 10 min y enfriada hasta temperatura ambiente (18-20°C). Esta disolución debe prepararse inmediatamente antes de ser utilizada y deberá permanecer saturada durante su uso y ser almacenada en oscuridad.

4. Disolución 0.1 N de tiosulfato sódico. Disolver 25 g de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ en 800 mL de agua recién hervida y enfriada. Agitar durante aproximadamente 15 min hasta que se disuelva completamente. Enrasar hasta un volumen final de 1000 mL. En caso necesario, emplear esta disolución para preparar disoluciones de tiosulfato de concentración inferior (0,01 N o 0,002 N. Para ello, diluir la disolución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1 N con agua destilada hervida y enfriada hasta alcanzar la concentración deseada.

4.4 Procedimiento experimental

1. Preparación de la muestra

Pesar entre 0,3 y 5 g de muestra de la grasa a analizar, con precisión de 0,001 g, en un matraz Erlenmeyer y cerrar herméticamente con un tapón de vidrio esmerilado hasta el inicio del análisis. La cantidad de muestra a pesar en cada caso se determinará en función del valor esperado de índice de peróxidos.

Tabla 1. Peso de la muestra y normalidad del tiosulfato a utilizar en el ensayo en función del índice de Peróxidos (IP) que se espera obtener.

IP (mEq O_2 /Kg)	Peso de la muestra (g)	Normalidad tiosulfato
de 0 a 12	de 5,0 a 2,0	0,002 N
de 12 a 20	de 2,0 a 1,2	0,01 N
de 20 a 30	de 1,2 a 0,8	0,1 N
de 30 a 50	de 0,8 a 0,5	0,1 N
de 50 a 90	de 0,5 a 0,3	0,1 N

En el caso de trabajar con grasas comestibles sólidas a temperatura ambiente se recomienda fundir la muestra antes de su análisis, calentando con agitación constante sobre una placa calefactora o en horno de aire a una temperatura unos 10 °C por encima de su punto de fusión. Hay que tener especial precaución en este paso para no someter la muestra a temperatura superior a 40 °C durante un periodo de tiempo prolongado.



2. Procedimiento

- Disolver la muestra de grasa rápidamente con 30 mL de la mezcla de disolvente $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{OH}$ y añadir 0,5 mL de la disolución saturada de KI. Tapar el Erlenmeyer, agitar ligeramente y dejar reposar a temperatura ambiente en oscuridad durante 1 min.
- A continuación, añadir 30 mL de agua destilada y comenzar la valoración con la disolución de tiosulfato hasta la aparición de una coloración ligeramente amarilla.
- En ese momento, incorporar 0,5 mL de la disolución indicadora de almidón de manera que la mezcla que se está valorando adquirirá una coloración azul oscuro.
- Continuar la valoración hasta que el color azul desaparezca y la muestra se vuelva incolora.
- Si el volumen de la disolución $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1 N empleado en la valoración es inferior a 0,5 mL, entonces se deberá repetir la valoración utilizando una disolución de tiosulfato de una concentración inferior, por ejemplo, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,01 N.
- Realizar siempre simultáneamente un ensayo en blanco por triplicado. Si el resultado de este ensayo en blanco es superior a 0,1 mL de la disolución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,01 N, sustituir los reactivos. El promedio de los valores del blanco se restará al volumen obtenido durante la valoración de la muestra.

4.5 Cálculos y expresión de los resultados

El índice de peróxidos indica los miliequivalentes de oxígeno en forma de peróxido por Kilogramo de grasa y se calcula empleando la siguiente ecuación:

$$\text{IP} \left(\text{mEq} \frac{\text{O}_2}{\text{Kg}} \right) = \frac{(V_{\text{muestra}} - V_{\text{blanco}}) \cdot N \cdot 1000}{m_{\text{aceite}}}$$

Donde:

V_{muestra} : mL de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ empleados en la valoración de la muestra

V_{blanco} : mL de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ empleados en la valoración del blanco

N: Normalidad exacta de la disolución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ empleada en la valoración

m_{aceite} : peso en g de muestra empleados en la determinación

El resultado final corresponderá a la media aritmética de las réplicas efectuadas en cada ensayo y el resultado de la determinación se expresará con una sola cifra decimal.

4.6 Caso práctico



En la UE, las normas relativas a los controles de conformidad de las normas de comercialización del aceite de oliva y a los métodos de análisis de las características del aceite de oliva están recogidos en el Reglamento de Ejecución (UE) 2022/2015. En este reglamento, aparecen definidos, entre otros aspectos, las características de los aceites de oliva que son comercializados dentro de la UE, de manera que los valores de estos parámetros definen la clasificación del producto en sus diferentes categorías, desde el aceite de oliva virgen extra (AOVE) hasta el aceite de orujo de oliva (AOO). Asimismo, la introducción de requisitos mínimos de control para todos los Estados miembros contribuye a la lucha contra el fraude en este tipo de aceite.

Vamos a ver como ejemplo el caso del aceite de oliva virgen extra y comprobar si un aceite cumpliría con los requisitos establecidos en la legislación para el parámetro de índice de peróxidos a partir de los datos recogidos en el laboratorio.

Para determinar las características de calidad de un aceite de oliva virgen extra se desea calcular, entre otros parámetros, su valor de índice de peróxidos. Para ello, se realiza por triplicado el análisis de este parámetro siguiendo el procediendo descrito anteriormente. Los resultados obtenidos en el laboratorio son los siguientes:

Primera valoración: se pesan 1,810 g del aceite empleando 3,181 mL de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,01N

Segunda valoración: se pesan 1,822 g del aceite empleando 3,202 mL de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,01N

Tercera valoración: se pesan 1,815 g del aceite empleando 3,190 mL de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,01N

En paralelo, se realiza el ensayo en blanco por triplicado, siendo la media aritmética de estas repeticiones igual a 0,102 mL.

Según estos resultados en valor del IP será en cada repetición del ensayo:

$$\text{IP} \left(\text{mEq} \frac{\text{O}_2}{\text{Kg}} \right) = \frac{(3,181-0,102) \cdot 0,01 \cdot 1000}{1,810} = 17,011 \text{ mEq} \frac{\text{O}_2}{\text{Kg}}$$

$$\text{IP} \left(\text{mEq} \frac{\text{O}_2}{\text{Kg}} \right) = \frac{(3,202-0,102) \cdot 0,01 \cdot 1000}{1,822} = 17,014 \text{ mEq} \frac{\text{O}_2}{\text{Kg}}$$

$$\text{IP} \left(\text{mEq} \frac{\text{O}_2}{\text{Kg}} \right) = \frac{(3,190-0,102) \cdot 0,01 \cdot 1000}{1,815} = 17,014 \text{ mEq} \frac{\text{O}_2}{\text{Kg}}$$

Después de calcular la media aritmética de las 3 repeticiones, se concluye que el valor del índice de peróxidos del aceite analizado corresponde a 17,013 mEqO₂/kg.



La legislación vigente en la UE, según el Reglamento de Ejecución (UE) 2022/2015 por el que se establecen las normas relativas a los controles de conformidad de las normas de comercialización del aceite de oliva y a los métodos de análisis de las características del aceite de oliva, establece como criterio de calidad para el aceite de oliva virgen extra un valor de IP inferior a 20 mEqO₂/kg, por lo que el aceite de oliva analizado cumpliría con los parámetros de calidad establecidos en la legislación.

5 Cierre

A lo largo de este documento hemos visto los diferentes fenómenos de oxidación de las grasas comestibles, el enranciamiento lipolítico o lipólisis y, especialmente, el enranciamiento oxidativo o autooxidación. Además, se ha descrito la metodología de análisis empleada para determinar el grado de oxidación primaria de una grasa mediante el índice de peróxidos. Finalmente, hemos visto un caso práctico tomando como ejemplo el análisis de un aceite de oliva virgen extra para comprobar si este alimento cumple con los valores establecidos en la legislación para este parámetro.

6 Bibliografía

AOAC Method 965.33. "Peroxide Value of Oils and Fats". Ed. Official Methods of Analysis of AOAC International 16 th Edition, 1997.

Belitz, H.D., Grosh, W., Schieberle, P. "Lipids" en Food Chemistry, Ed. Springer, 2009, págs. 158-248.

Nielsen, S.S, Qian, M.C., Pike, O.A. "Fat Characterization" en Food Analysis Laboratory Manual, Ed. Springer, 2017, pág. 185-194.

Reglamento de Ejecución (UE) 2022/2105 de la Comisión de 29 de julio de 2022 por el que se establecen las normas relativas a los controles de conformidad de las normas de comercialización del aceite de oliva y a los métodos de análisis de las características del aceite de oliva. Publicado en «DOUE» núm. 284, de 4 de noviembre de 2022, págs 23 a 48.