



Determinación del valor de *p*- anisidina 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

La oxidación de las grasas es un aspecto de especial interés para la industria alimentaria, ya que el nivel de oxidación tiene un gran impacto en la calidad de las mismas. Para evaluar el grado de oxidación de las grasas comestibles se emplean diferentes parámetros. El valor de *p*-anisidina evalúa la oxidación secundaria de sustancias grasas y se correlaciona con la presencia de aldehídos y cetonas, responsables del olor y sabor rancio. Además, su determinación en aceites proporciona información sobre el deterioro producido durante el proceso de fritura. El índice de *p*-anisidina determina el contenido en aldehídos insaturados de la materia grasa analizada, principalmente los 2-alquenas. Esta determinación está basada en la medida de la absorbancia a 350 nm del producto obtenido por reacción entre los compuestos aldehídicos presentes en la muestra y la *p*-anisidina.

2 Objetivos

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

- Llevar a cabo la determinación del índice de *p*-anisidina empleando una técnica espectrofotométrica.
- Determinar la calidad y el nivel de oxidación de un aceite comestible a partir del índice de *p*-anisidina del mismo.

3 Introducción

La principal forma de oxidación de las grasas comestibles se produce a través del proceso de autooxidación. Este proceso provoca una reacción de propagación en cadena de radicales libres, en la que a partir de ácidos grasos y oxígeno se van formando peróxidos e hidroperóxidos. Los peróxidos e hidroperóxidos son altamente inestables, por lo que se pueden romper dando lugar a más radicales libres, que vuelven a entrar en la cadena de oxidación. Al aumentar la cantidad de radicales libres, estos empiezan a interactuar entre sí y su concentración comienza a disminuir apareciendo productos de oxidación secundarios que incluyen compuestos volátiles como aldehídos, cetonas, ácidos, ésteres, alcoholes y compuestos aromáticos. Estos compuestos secundarios de la oxidación son los responsables del olor y sabor a rancio de las grasas oxidadas y además se ha demostrado que presentan una alta toxicidad.

Debido a la gran cantidad de productos que se generan durante las diferentes etapas del proceso de oxidación, resulta difícil la selección de un solo procedimiento de análisis, ya que cada uno de los métodos de análisis empleados permite medir únicamente uno o varios de los grupos funcionales que se forman en cada momento. Para evaluar estados incipientes de la oxidación se emplea habitualmente el índice de peróxidos, pero si lo que nos interesa es medir los estados avanzados de la oxidación de las grasas comestibles se recomiendan otros índices, como el test del ácido tiobarbitúrico (TBA) y el valor de *p*-anisidina.

El índice de TBA permite cuantificar los compuestos carbonílicos (aldehídos y cetonas), siendo el malonadehído el componente mayoritario. Esta determinación se basa en la reacción del TBA con el malonaldehído y la posterior medida de la absorbancia del cromógeno formado.

El índice de *p*-anisidina, por su parte, constituye una determinación del contenido en aldehídos insaturados de una materia grasa, principalmente los 2-alquenes y 2,4-dienales. El valor de *p*-anisidina es considerado un buen indicador de la oxidación cuando se trata de ensayos de almacenamiento durante periodos de tiempo prolongados. Además, es un parámetro empleado para proporcionar información sobre el deterioro de los aceites durante el proceso de fritura.

Algunas de las limitaciones de este índice son su baja especificidad y la tendencia a verse influenciado por otros factores, como el estado físico de los lípidos, la composición de ácidos grasos y las condiciones de almacenamiento, lo que limita su aplicación en algunos casos.

4 Desarrollo

A continuación, describiremos el procedimiento de análisis empleado para la determinación del valor de *p*-anisidina de una grasa comestible. Para ello, se describirá la preparación de los reactivos necesarios para este análisis, los pasos establecidos en el protocolo de laboratorio y los cálculos necesarios para obtener el resultado final. Finalmente, veremos un ejemplo práctico dónde calcularemos el valor de *p*-anisidina en diferentes muestras de aceite.

4.1 Fundamento

El índice de *p*-anisidina cuantifica los productos de oxidación secundarios generados durante la descomposición de hidroperóxidos en compuestos carbonílicos, como aldehídos, cetonas y alcoholes. La *p*-anisidina reacciona en condiciones ácidas, con los compuestos carbonílicos presentes en las grasas y aceites oxidados para formar un producto coloreado que tiene su máxima absorbancia a una longitud de onda de 350 nm, lo que permite la cuantificación de los productos secundarios de oxidación mediante espectrofotometría. La intensidad del color de los productos de reacción amarillenta depende no solo de la cantidad de compuesto aldehído presente sino también de sus estructuras. Por ejemplo, la presencia de un doble enlace carbonilo incrementa la absorbancia molar de 4 a 5 veces, lo que significa que los 2-alquenes y dienales, tendrán una mayor contribución sobre el valor de *p*-anisidina final que otros componentes.

El protocolo de análisis que se describe a continuación está basado en la medida de la absorbancia a 350 nm del producto obtenido por reacción entre los compuestos aldehídicos presentes en la muestra y la *p*-anisidina, tal y como se describe en el método oficial Cd 18-90 de la *American Oil Chemists' Society* (AOCS). El valor de *p*-anisidina se define como 100 veces la densidad óptica a 350 nm de una disolución que contiene 1 g de la grasa a analizar diluida hasta 100 mL de una mezcla del disolvente (isooctano) con *p*-anisidina (disolución al 1% de aceite).

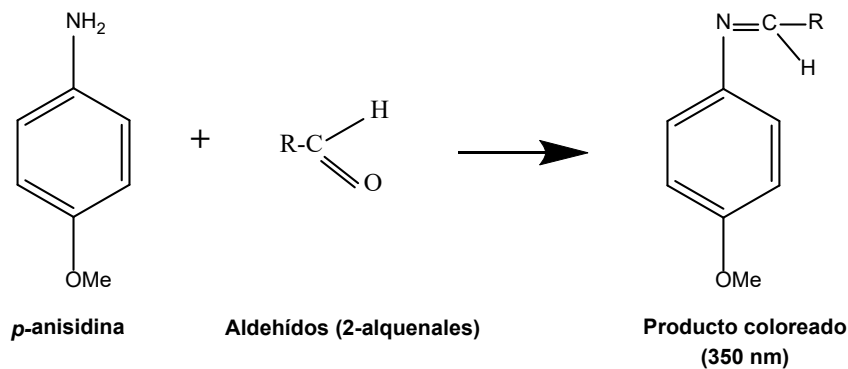


Figura 1. Reacción de la *p*-anisidina con el aldehído para formar el producto coloreado.

4.2 Materiales y reactivos

Material e instrumentación:

- Balanza analítica
- Tubos de centrifuga de 50 mL
- Micropipetas
- Cubetas de vidrio o cubetas desechables de PMMA para espectrofotómetro
- Centrifuga
- Espectrofotómetro UV-vis

Reactivos químicos:

- Isooctano (2,2,4 trimetilpentano) de grado analítico
- Ácido acético glacial de grado analítico
- *p*-anisidina 98% de grado analítico

Aspectos relativos a la seguridad en el manejo de los reactivos empleados en el análisis:

- El Isooctano es inflamable y presenta riesgo de incendio. Es tóxico por ingestión e inhalación, por lo que siempre que se trabaje con este disolvente debe hacerse en campana de extracción de gases.
- El ácido acético en su estado puro es moderadamente tóxico por ingestión e inhalación, y es un irritante fuerte para la piel y tejidos.
- El reactivo de *p*-anisidina es un compuesto irritante y altamente tóxico por inhalación, ingestión y por contacto con la piel. Se trata de una amina aromática, clasificada como posible agente cancerígeno, pudiendo causar daños en los órganos después de una exposición prolongada. Es por ello, que este reactivo debe ser manipulado con especial precaución, preferiblemente en campana de extracción.



4.3 Procedimiento experimental

1. Preparación de los reactivos

- Preparación de la solución de *p*-anisidina (0.25%). Se disuelven 0,25 g de *p*-anisidina en 100 mL de ácido acético glacial. Esta disolución no deberá tener una absorbancia superior a 0,2 medida a 350 nm en una cubeta de 1 cm de paso. En el caso de que su lectura de absorbancia fuera superior, la disolución deberá ser preparada nuevamente. Durante el almacenamiento, la *p*-anisidina presenta una coloración crema claro, pero tiende a oscurecer como consecuencia de su oxidación. Por ello, se recomienda el almacenamiento de este reactivo entre 0 y 4 °C en una botella de color topacio.
- Disolvente. En esta prueba puede reemplazarse el isooctano por n-hexano. Sin embargo, en el caso de aceites con una alta cantidad de ácidos grasos oxidados, estos no se disolverán completamente en n-hexano, por lo que se recomienda el uso de isooctano. La absorbancia del disolvente (isooctano o n-hexano), medida entre 300 y 380 nm en una cubeta de 1cm de paso, debe ser nula o casi nula.

2. Preparación de la muestra

La muestra de ensayo debe estar perfectamente seca y clara. En caso contrario, la muestra deberá ser filtrada a través de papel de filtro.

3. Procedimiento de análisis

- En un matraz aforado de 25 mL se pesan entre 0,5 y 4,0 g de la muestra, según sea el valor esperado. La cantidad pesada debe ser la necesaria para que la absorbancia medida en el espectrofotómetro esté comprendida entre 0,2 y 0,8.
- La muestra se disuelve en isooctano y se enrasa hasta completar el valor de 25 mL.
- A continuación, la disolución se lleva a un tubo de centrifuga, y se centrifuga a 4000 rpm a 15 °C durante 20 min.
- Se toman 2 mL del sobrenadante y se mide la absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 350 nm (valor A_b), utilizando como referencia una cubeta pareada con el mismo disolvente.
- Paralelamente, se toman 2 mL del sobrenadante y se mezclan con 400 μ L de la solución de *p*-anisidina 0,25 %. La mezcla se agita, se incuba en oscuridad a temperatura ambiente durante 10 min y se mide la absorbancia de la muestra a 350 nm (valor A_s). En este caso se toma como valor del blanco una cubeta con 2 mL del disolvente y 400 μ L de la disolución de *p*-anisidina 0,25 %, también incubada bajo las mismas condiciones durante 10 min.
- Si la absorbancia de la muestra excede de 1, es necesario repetir el ensayo con un peso de muestra menor.
- Cada muestra se determina por triplicado.

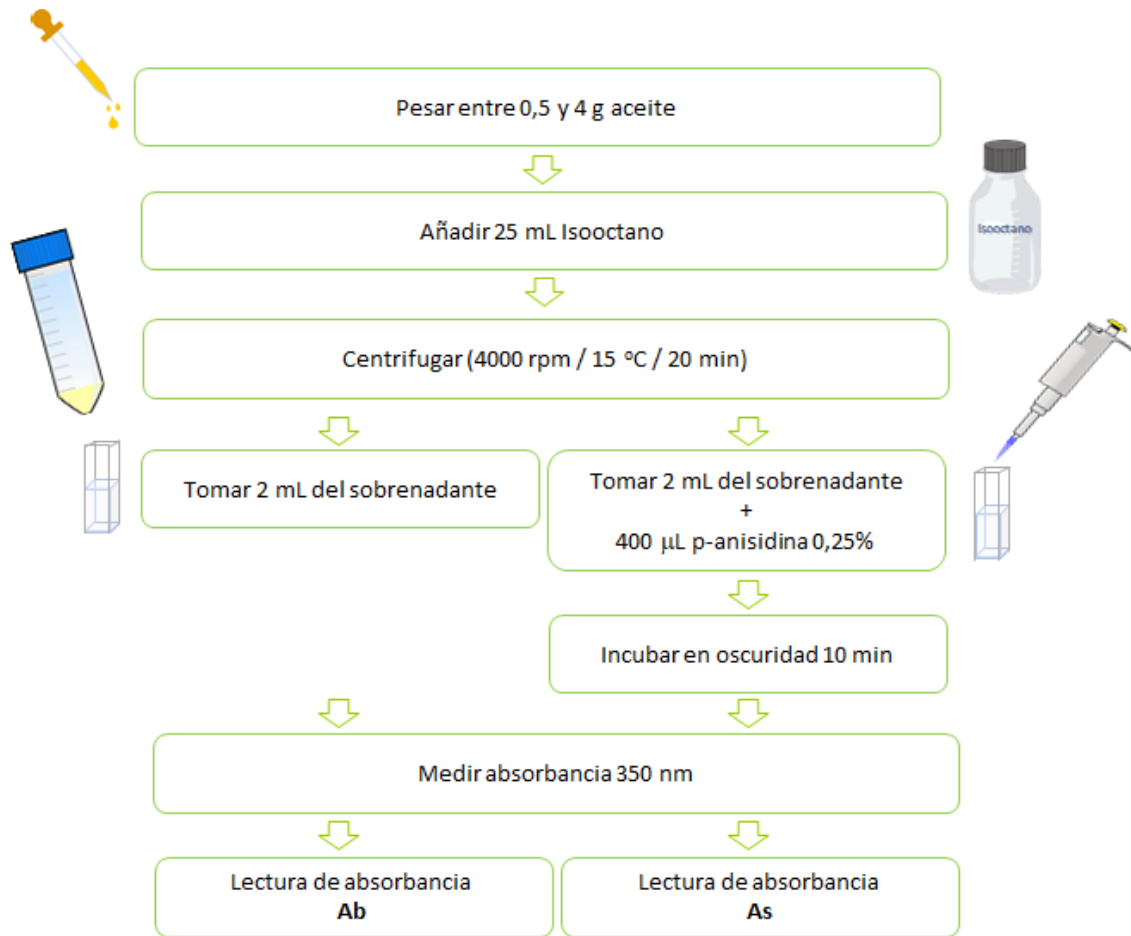


Figura 2. Esquema del procedimiento de determinación del valor de *p*-anisidina.

4.4 Cálculos

El valor de *p*-anisidina (VA) se calcula mediante la siguiente expresión:

$$VA = \frac{25 \cdot (1,2 As - Ab)}{m}$$

Donde:

As: absorbancia de la disolución de materia grasa después de reaccionar con la *p*-anisidina

Ab: absorbancia de la disolución de la materia grasa

m: masa, en gramos, de la muestra de grasa analizada

5 Cierre

A lo largo de este documento hemos visto cómo determinar el grado de oxidación secundaria de una grasa comestible empleando el índice de *p*-anisidina. Para ello, hemos revisado el fundamento de esta técnica analítica y el protocolo a seguir en el laboratorio para llevar a cabo



esta determinación. Además, hemos descrito cómo realizar los cálculos necesarios para obtener el valor de *p*-anisidina según este procedimiento.

6 Bibliografía

AOCS Official Method C18-90 *p*-anisidine value.

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

Pike, O.A. y O'Keefe, S. "Fat Characterization" en Food Analysis, Ed. Springer, 2017, pág. 407-729.