



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



INSTITUTO DE INGENIERÍA DE
ALIMENTOS PARA EL DESARROLLO

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos
(FoodUPV)

Monitorización de la oxidación de aceites marinos mediante
técnicas de análisis de imagen

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Gestión de la Seguridad y Calidad
Alimentaria

AUTOR/A: Lázaro Mora, Javier

Tutor/a: Fuentes López, Ana

Cotutor/a: Grau Meló, Raúl

Director/a Experimental: VERDU AMAT, SAMUEL

CURSO ACADÉMICO: 2022/2023

MONITORIZACIÓN DE LA OXIDACIÓN DE ACEITES MARINOS MEDIANTE TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE IMAGEN

Lázaro Mora, Javier¹; Grau Meló, Raúl¹; Fuentes López, Ana¹.

RESUMEN

Los aceites de origen marino son productos con un elevado valor nutricional, sin embargo, su alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados los convierte en productos altamente susceptibles al deterioro oxidativo. Existen diferentes métodos analíticos para determinar el grado de oxidación de estos aceites, aunque estas técnicas presentan ciertos inconvenientes como su carácter destructivo de la muestra y en algunos casos baja especificidad y ejecución compleja. El objetivo del presente trabajo es evaluar el empleo de dos técnicas de análisis de imagen, dispersión láser y multiespectral, para evaluar la oxidación de diferentes aceites marinos. Para ello, muestras de aceite de hígado de bacalao y aceite de Calanus se sometieron a diferentes tratamientos térmicos (180, 200 y 220 °C durante 5, 15 y 30 min). Las muestras de aceite se almacenaron a temperatura controlada y se analizaron periódicamente durante un periodo de 30 días. Durante el almacenamiento se determinaron los valores de índice de peróxidos y el valor de anisidina y se recogió la información generada por la interacción aceite-luz mediante imágenes digitales. Los resultados analíticos obtenidos evidenciaron el avance del estado de oxidación de los aceites marinos durante el almacenamiento, independientemente del tratamiento térmico aplicado. Sin embargo, las técnicas de análisis de imagen no fueron capaces de registrar estos cambios en la calidad de los aceites durante su conservación, por lo que no se considerarían técnicas adecuadas para monitorizar la calidad de estos aceites durante su conservación a temperatura ambiente.

PALABRAS CLAVE: aceites marinos; oxidación; índice de peróxidos; valor de anisidina; análisis de imagen; calidad

ABSTRACT

Oils of marine origin are products with a high nutritional value, however, their high content of polyunsaturated fatty acids makes them highly susceptible to oxidative deterioration. There are different analytical methods to determine the degree of oxidation of these oils, although these techniques have certain drawbacks such as their destructive nature of the sample and in some cases low specificity and complex execution. The objective of this work is to evaluate the use of two image analysis techniques, laser and multispectral scattering, to evaluate the oxidation of different marine oils. For this, samples of cod liver oil and Calanus oil were subjected to different heat treatments (180, 200 and 220 °C for 5, 15 and 30 min). The oil samples were stored at controlled temperature and analyzed periodically over a period of 30 days. During storage, the peroxide index values and the anisidine value were determined and the information generated by the oil-light interaction was collected using

¹ Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos (FoodUPV). Universitat Politècnica de València. Camino de Vera s/n, 46022, Valencia, España.

digital images. The analytical results obtained showed the advancement of the oxidation state of the marine oils during storage, regardless of the thermal treatment applied. However, image analysis techniques were not able to record these changes in the quality of the oils during their conservation, so they would not be considered adequate techniques to monitor the quality of these oils during their conservation at room temperature.

KEY WORDS: marine oils; oxidation; peroxide index; anisidine value; image analysis; quality

RESUM

Els olis d'origen marí són productes amb un valor nutricional elevat, però el seu alt contingut en àcids grassos poliinsaturats els converteix en productes altament susceptibles al deteriorament oxidatiu. Hi ha diferents mètodes analítics per determinar el grau d'oxidació d'aquests olis, encara que aquestes tècniques presenten certs inconvenients com el caràcter destructiu de la mostra i en alguns casos baixa especificitat i execució complexa. L'objectiu del present treball és avaluar l'ús de dues tècniques d'anàlisi d'imatge, dispersió làser i multiespectral per avaluar l'oxidació de diferents olis marins. Per fer-ho, mostres d'oli de fetge de bacallà i oli de Calanus es van sotmetre a diferents tractaments tèrmics (180, 200 i 220 °C durant 5, 15 i 30 min). Les mostres d'oli s'han emmagatzemat a temperatura controlada i s'han analitzat periòdicament durant un període de 30 dies. Durant l'emmagatzematge es van determinar els valors d'índex de peròxids i el valor d'anisidina i es va recollir la informació generada per la interacció oli-llum mitjançant imatges digitals. Els resultats analítics obtinguts van evidenciar l'avenç de l'estat d'oxidació dels olis marins durant l'emmagatzematge, independentment del tractament tèrmic aplicat. Tot i això, les tècniques d'anàlisi d'imatge no van ser capaces de registrar aquests canvis en la qualitat dels olis durant la seva conservació, per la qual cosa no es considerarien tècniques adequades per monitoritzar la qualitat d'aquests olis durant la seva conservació a temperatura ambient.

PARAULES CLAU: olis marins; oxidació; índex de peròxids; valor d'anisidina; anàlisi d'imatge; qualitat

1. INTRODUCCIÓN

El aceite de pescado es un producto industrial de alto valor nutricional por su contenido de ácidos grasos omega-3 de cadena larga, los cuales han adquirido gran importancia por sus efectos beneficiosos sobre la salud y en la nutrición y que únicamente se encuentran en fuentes marinas (Valenzuela et al., 2012). Entre los ácidos grasos omega-3, el eicosapentaenoico (EPA) y el docosahexaenoico (DHA) son especialmente valorados por sus propiedades profilácticas y terapéuticas, ayudando a disminuir el riesgo de padecer determinadas enfermedades (Lee et al., 2008), ejerciendo un papel esencial en el desarrollo infantil, actuando en la protección de la salud cardiovascular (Sheron Ramírez et al., 2019) y por su implicación en numerosas funciones cerebrales, como la memoria y la visión, o también el desarrollo cerebral del feto (Kalmijn et al., 2004),

En los últimos años se ha observado un creciente interés en la utilización de los aceites de pescado y marinos para su uso como ingredientes o como suplementos alimentarios, en concreto los aceites de hígado de bacalao, de krill y de calanus, por posibles beneficios para la salud. Sin embargo, debido a su elevado contenido de ácidos grasos poliinsaturados, los aceites de pescado presentan una alta susceptibilidad a los procesos autooxidativos, lo que provoca un deterioro rápido de su calidad y en una reducción de su vida útil. Los procesos oxidativos conducen a la formación de componentes indeseables que afectan la calidad sensorial del producto, disminuyendo así la aceptación del mismo (Mori et al., 2019) y la generación de determinados compuestos que también tienen efectos nocivos para la salud. Al inicio de los procesos oxidativos, los productos de oxidación primarios, como los hidroperóxidos, pueden descomponerse en productos de oxidación secundarios, como aldehídos o cetonas, que son altamente reactivos y citotóxicos (Choe y Min, 2006).

Con el objetivo de establecer el estado oxidativo de los aceites marinos, se pueden emplear diferentes técnicas (Landines y Zambrano, 2009). Estos métodos para determinar el grado de oxidación de lípidos se pueden dividir en dos grupos, aquellos empleados para determinar los productos de oxidación primarios y los que miden los productos de oxidación secundarios (Rustad, 2009). Asimismo, los métodos utilizados para determinar la oxidación lipídica se pueden clasificar en directos e indirectos. En los métodos directos, el nivel de oxidación se mide utilizando los productos primarios o secundarios de la oxidación de lípidos, mientras que en los métodos indirectos se utilizan el método fluorométrico y la evaluación sensorial (Abeyrathne et al., 2021). Los métodos más utilizados para detectar los productos de oxidación primaria y secundaria en aceites son el índice de peróxidos, el test de *p*-anisidina y el índice de oxidación total (TOTOX) (Cong et al., 2020).

Desde hace años se dedica especial atención al desarrollo de nuevas técnicas que permitan un control más efectivo del proceso de oxidación lipídica (Navarro-García et al., 2004), pero incluso con la cantidad de métodos diferentes que se utilizan, hoy en día no es posible utilizar un único método para determinar la oxidación de lípidos (Kuksis et al., 2003).

El objetivo del presente trabajo es evaluar el empleo del análisis de imagen de dispersión láser y el de imágenes multiespectrales para evaluar la

oxidación de diferentes aceites marinos.

Este trabajo presenta una vinculación directa con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS), en concreto contribuye a los siguientes ODS: ODS3 (Salud y bienestar) garantizando que los alimentos que llegan a la cadena alimentaria presentan un valor nutricional óptimo y son microbiológicamente seguros y ODS9 (Industria, innovación e infraestructura) mediante el desarrollo de nuevas estrategias que permitan a la industria alimentaria conocer el estado de oxidación de un aceite y realizar un uso más eficiente de los recursos (**ANEXO I**).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Revisión bibliográfica sobre los procedimientos empleados para evaluar la oxidación lipídica

Con el objetivo de analizar los parámetros y técnicas analíticas empleadas en la actualidad para evaluar la oxidación de las grasas y establecer las ventajas e inconvenientes de cada una de estas técnicas, se llevó a cabo una revisión bibliográfica empleando las bases de datos de PubMed, ScienceDirect, Scopus y Google Scholar. Estas páginas ofrecen acceso gratuito, siempre que se forme parte de determinadas instituciones afiliadas (como es el caso de la UPV), a diferentes tipos de registros, entre los que se encuentran artículos científicos y técnicos, libros, revistas científicas y publicaciones en congresos, publicados por diferentes autores.

Las palabras clave que se emplearon en la búsqueda bibliográfica fueron "oxidación lipídica", " aceites comestibles" y "estabilidad oxidativa". Se revisaron el título y el resumen de los estudios y se descargaron artículos adecuados para la revisión del texto completo.

2.2. Estudio de la oxidación de aceites marinos

2.2.1. Materiales

Para la realización de este estudio se utilizaron dos tipos de aceites de origen marino, un aceite de hígado de bacalao (Guinama S.L.U., La Pobla de Vallbona, Valencia, España) y un aceite marino de zooplancton (*Calanus finmarchicus*) (Zooca-Calanus AS, Tromsø, Noruega). Estos aceites están autorizados para uso alimentario y farmacéutico y no contenían ningún aditivo para facilitar su conservación.

Los reactivos utilizados para los análisis químicos descritos en los siguientes apartados fueron en el caso del análisis de índice de peróxidos: tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) suministrado por Scharlab S.L. (Barcelona, España) para preparar la disolución valorante, se utilizaron ácido acético (CH_3COOH) y 1-decanol ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{OH}$) suministrados por (Panreac Química S.L.U., Barcelona, España) para preparar el disolvente y yoduro potásico (KI) suministrado por Scharlab S.L. para preparar una disolución saturada. En la determinación del índice de *p*-anisidina se empleó isooctano (2,2,4 trimetilpentano) suministrado por Labkem (Barcelona, España), *p*-anisidina 98% (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) y ácido acético glacial (Panreac Química S.L.U.). Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico.

2.2.2. Preparación de la muestra

Con el objetivo de evaluar la evolución de la calidad y estado de oxidación de los aceites marinos tras ser sometidos a altas temperaturas, los aceites empleados en el estudio se sometieron a diferentes tratamientos térmicos. Para llevar a cabo los diferentes tratamientos, se introdujeron 50 mL de los aceites de hígado de bacalao y de *Calanus* en viales de vidrio color topacio. Los viales se dispusieron en una gradilla metálica, la cual se colocó en el centro de un horno industrial previamente precalentado a la temperatura objetivo. Cada uno de los aceites se sometió a 9 tratamientos térmicos diferentes, conseguidos mediante la combinación de 3 temperaturas diferentes (180, 200 y 220 °C) durante 3 intervalos de tiempos distintos (5, 15 y 30 min). Cada uno de estos tratamientos se repitió por triplicado.

Durante la realización de los ensayos, se incluyó un vial adicional en el centro de la gradilla con 50 mL de aceite el cual fue utilizado para monitorizar la evaluación de la temperatura de las muestras. De esta forma se garantizó que los aceites se habían mantenido bajo las condiciones de tiempo y temperatura marcadas como objetivo en cada tratamiento. Para ello se emplearon temporales tipo T, colocados en el centro del vial y los registros de temperatura se realizaron empleando una unidad de adquisición de datos DATA LOGGER Agilent 34970A (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA).

Una vez finalizado el tratamiento térmico, los viales se retiraron del horno, se atemperaron durante 5 min y el contenido de cada uno de ellos se traspasó a nuevos viales topacio para su almacenamiento.

2.2.3. Determinaciones analíticas

Para determinar el grado de oxidación de las muestras se emplearon dos técnicas de análisis, el índice de peróxidos para la determinación del grado de oxidación primaria, y el índice de *p*-anisidina para evaluar estados más avanzados de la oxidación u oxidación secundaria.

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. Para llevar a cabo dicho procedimiento de análisis se siguió el protocolo analítico descrito por la AOAC (1997). Para la valoración se empleó un valorador automático Metrohm 905 titrando (Metrohm AG, Herisau, Suiza).

El índice de *p*-anisidina se emplea para cuantificar los productos de oxidación secundarios. La *p*-anisidina reacciona en condiciones ácidas, con los compuestos carbonílicos presentes en las grasas y aceites oxidados para formar un producto coloreado, cuya máxima absorbancia se encuentra a una longitud de onda de 350 nm, lo que permite la cuantificación de los productos secundarios de oxidación mediante espectrofotometría. 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. Para esta determinación se empleó el protocolo Cd 18-90 de la *American Oil Chemists Society* (AOCS).

Todas las determinaciones analíticas de cada se realizaron por triplicado.

2.2.4. Análisis de imagen

Para evaluar el efecto de la temperatura y tiempo de tratamiento térmico, así como de almacenamiento, se aplicaron dos tipos de técnicas de imagen. Para ello, 3 mL de cada aceite se depositaron en uno de los pocillos de una placa de pocillos transparente (placa de 12 pocillos, 21,2 mm \varnothing , 6,9 mL, Corning Costar®) los cuales fueron evaluados por ambas técnicas.

a) Basada en la luz estructurada. Patrones de dispersión láser.

El dispositivo de imagen fue diseñado para capturar, en imágenes digitales, la variabilidad proyectada por los patrones de difracción generados después de una interacción entre la luz y la matriz de los alimentos. La luz estructurada (láser) se transmite a lo largo de la matriz estudiada, desde las superficies inferiores hacia las superiores, respondiendo a posibles interacciones con los componentes del alimento (en este caso aceite). La variabilidad generada puede ser modelizada a partir de los datos extraídos de las imágenes digitales de los patrones de difracción resultantes (Verdú et al., 2020). El **ANEXO II** muestra un esquema de la configuración del dispositivo. Los elementos fueron una cámara digital, tres luces láser y un ordenador. El dispositivo está instalado dentro de una caja oscura, lejos de la contaminación lumínica externa. Los parámetros de captura de la cámara se configuraron en modo manual, evitando alteraciones incontroladas en el régimen de trabajo (ganancia, velocidad de obturación, balance de blancos, etc.). El sistema de captura fue una cámara digital Logitech C920 (1080p/30 fps - 720p/30 fps). La cámara se colocó verticalmente a 15 cm sobre el recipiente de muestra ubicado en el medio del campo visual. Se utilizaron tres punteros láser (1 mm θ , 50 mW), que tenían longitudes de onda de 650 nm (R), 550 nm (G) y 450 nm (B). Se colocaron perpendicularmente a 20 cm por debajo de la zona donde se colocó la placa de pocillos. Las imágenes de los patrones de difracción de cada longitud de onda se capturaron individualmente durante los tiempos de emisión de luz, 3 s por láser en el orden R, G y B (**ANEXO II**). El objetivo de esta configuración era transmitir suficiente luz para proyectar la variabilidad de la matriz estudiada sin saturar el sensor de la cámara. Se tomaron siete réplicas de imágenes por muestra. Así, se capturaron 21 patrones de difracción por muestra en imágenes para su posterior procesamiento (7xR+7xG+7xB). Las imágenes se adquirieron en formato RGB y se guardaron como JPEG (1980 x 1080).

Una vez obtenidas las imágenes, se procesaron para extraer información de los patrones de difracción generados durante las interacciones entre la matriz del aceite y la luz. El procesamiento de imágenes se realizó con el objetivo de probar la información generada por cada longitud de onda de forma individual y concatenada. El procesamiento de imágenes y la extracción de datos se realizaron de la siguiente manera:

- Se extrajo la intensidad, en escala de grises, de cada píxel colocado a lo largo del diámetro de cada patrón de difracción como un vector numérico formado por 195 valores (una línea de 195 píxeles).
- Los vectores extraídos de los patrones de difracción R, G y B se unieron para crear una versión concatenada de todos los datos de los láseres (195 valores x 3).

- El espectro final para cada muestra fue la media de las siete mediciones antes mencionadas. Ese espectro representó una huella digital de 585 variables de cada muestra.
- Los espectros extraídos del experimento se colocaron en matrices de m filas (número de muestras) y n=585 columnas (estudios de datos de longitud de onda láser concatenados). El formato de la matriz de datos generada permitió aplicar métodos estadísticos multivariados para modelar la varianza capturada en las imágenes.

b) Basada en imágenes multiespectrales

El procedimiento para la captura de imágenes se basó en estudios realizados por el grupo de investigación de la UPV (Verdú et al., 2022). Para ello, se tomaron imágenes empleando filtros de diferentes longitudes de onda, obteniendo de este modo imágenes que al ser concatenadas formaron el grupo de imágenes multiespectrales de cada uno de los aceites. La longitud de onda de los filtros utilizados fue 450-520-570-650-750-850-950 nm.

La cámara utilizada para la captura de las imágenes fue la misma que en el caso anterior. De igual forma, todo el dispositivo de captura estaba dispuesto en el interior de una cabina oscura. Las muestras fueron situadas a una distancia de 16 cm de la cámara, utilizándose para todo el estudio la misma fuente de luz. Una vez obtenidas las imágenes, estas fueron procesadas de igual forma que en el caso anterior, si bien en este caso, el espectro de intensidades para cada muestra estaba dispuesto por la concatenación de las intensidades de la línea de píxeles de cada una de las siete imágenes (una por cada filtro). Este espectro obtenido para cada muestra fue utilizado posteriormente para el análisis estadístico multivariante.

2.2.5. Análisis estadístico

En el análisis estadístico de los resultados obtenidos se empleó el programa Statgraphics Centurion XIX (Statgraphics Technologies, Inc., Virginia, EE.UU). Con el objetivo de evaluar el efecto del tratamiento térmico y del tiempo de almacenamiento sobre la oxidación de los aceites se llevó a cabo un análisis multifactorial de la varianza (ANOVA multifactorial) considerando como variables los parámetros químicos analizados (índice de peróxidos y valor de p-anisidina) y como factores la temperatura de calentamiento (T) y tiempo de calentamiento de los aceites (t) y el tiempo de almacenamiento (A). En todos los casos, se utilizó el procedimiento LSD (*least significant difference*) para comprobar las diferencias a un nivel de significación del 5%.

En el caso de los resultados procedentes del análisis de imagen, los espectros obtenidos fueron evaluados mediante el análisis estadístico multivariado no supervisado, análisis de componentes principales (PCA). Este método se utilizó para reducir la dimensionalidad de un gran conjunto de variables cuantitativas (espectros de transmitancia) a una pequeña cantidad de nuevas variables, llamadas componentes principales (Principal Components, PC), que son el resultado de las combinaciones lineales de las variables originales. Para ello se utilizó el paquete informático PLS Toolbox, 6.3 (Eigenvector Research Inc., Wenatchee, Washington, EE. UU.), una

extensión de la caja de herramientas en el entorno computacional Matlab 7.6 (The Mathworks, Natick, Massachusetts, EE.UU.). Los valores de los PCs obtenidos fueron también evaluados mediante el análisis multifactorial de la varianza (ANOVA multifactorial) para evaluar el efecto del tratamiento térmico y del tiempo de almacenamiento sobre los PCs.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Revisión bibliográfica

El interés de este estudio nace de la necesidad de conocer la calidad y el grado de oxidación de las grasas y aceites, así como conocer cómo pueden afectar variaciones como la temperatura, la luz o el tiempo de almacenamiento a dicha oxidación. Para ello, en primer lugar, se llevó a cabo una revisión con el objetivo de establecer cuáles son las técnicas más utilizadas en la actualidad para evaluar la calidad de los aceites alimentarios y cuáles son los avances tecnológicos realizados en este sentido. Los resultados obtenidos de esta revisión bibliográfica se muestran en el **ANEXO III**.

La amplia variedad de factores que influyen en la oxidación, las diferentes composiciones de los aceites y grasas y la complejidad de las reacciones e interacciones durante la oxidación de lípidos, hacen prácticamente imposible desarrollar una técnica única para medir el grado de oxidación. Teniendo en cuenta la importancia que tiene la oxidación de las grasas sobre la calidad de los alimentos, es necesario medir el nivel de oxidación de estas para poder establecer estrategias que minimicen las pérdidas de dicha calidad. Por este motivo, se han desarrollado un amplio número de técnicas analíticas que ayudan en la identificación y cuantificación de cambios producidos en estos productos durante su almacenamiento y determinar los compuestos derivados de la oxidación lipídica (Domínguez et al., 2019). En este sentido, los métodos de análisis empleados para establecer el grado de oxidación de lipídica pueden medir cambios en productos primarios (formación de peróxidos, hidroperóxidos lipídicos y dienos/trienos conjugados) y cambios en productos secundarios (formación de carbonilos, aldehídos, volátiles y malondialdehído) (Shahidi, 1998).

Entre las técnicas empleadas para medir productos de oxidación primaria destacan el índice de peróxidos y el método naranja férrico-xilenol (FOX). El índice de peróxidos es muy utilizado por su simplicidad del procedimiento experimental, sin embargo, sus resultados pueden verse afectados por factores como la temperatura o la luz, además de no ser un método recomendado para grasas con elevado grado de insaturación (Domínguez et al., 2019; Rodríguez, 2013; Tarapoulouzi et al., 2022), mientras que el método FOX destaca por su sensibilidad y ser poco susceptible a la oxidación espontánea (Domínguez et al., 2019; Téllez et al., 2005). Otras técnicas empleadas para evaluar la oxidación incipiente de las grasas y aceites son aquellas empleadas para medir la formación de hidroperóxidos como la cromatografía de gases con espectrometría de masas. Las técnicas cromatográficas presentan una alta sensibilidad y permiten el análisis simultáneo de otras sustancias, pero son técnicas complejas, precisan en algunos casos de etapas previas de preparación y derivatización y requieren

de un equipamiento costoso y delicado (Kinter, 1995; Thomsen et al., 2016). Otra técnica empleada, el método colorimétrico con tiocianato férrico, es ampliamente utilizada en sistemas de emulsión pero sus reactivos presentan un precio elevado (Tarapoulouzi et al., 2022). Por último, destaca la determinación de dienos conjugados, técnica con elevada fiabilidad y con una menor cantidad de muestra necesaria, cuyos resultados pueden verse afectados por la temperatura y/o las condiciones de almacenamiento (Amft et al., 2023; Topkafa, 2020; Tarapoulouzi et al., 2022). Esta técnica se encarga de analizar la formación de compuestos conjugados por oxidación primaria.

En cuanto a las técnicas encargadas de medir productos de oxidación secundaria, destacan el índice de *p*-anisidina, el test de ácido tiobarbitúrico (TBA) y el test de Kreis para la determinación de aldehídos por oxidación secundaria. El índice de *p*-anisidina se emplea para determinar el contenido de aldehídos insaturados en una materia grasa como el aceite, principalmente los 2-alquenes y 2,4-dienes. Este método de análisis cuantifica los productos de oxidación secundarios generados durante la descomposición de hidroperóxidos en compuestos carbonílicos, como aldehídos, cetonas y alcoholes. El índice de *p*-anisidina es un buen indicador de la oxidación para grasas almacenadas durante períodos de tiempo prolongados, pero presenta una baja especificidad (Tarapoulouzi et al., 2022). El test TBA es uno de los métodos más utilizados para la peroxidación de lípidos, sin embargo, no es apropiado para detectar niveles bajos de oxidación (Kinter, 1995; Pikul et al., 1989; Rhee, 1978; Rubio-Hernández, 2020; Tarapoulouzi et al., 2022). Por otro lado, el test de Kreis permite medir la calidad de los aceites utilizados, pero es un método subjetivo (Segurondo y Cortez, 2020; Hammond y White, 2011). Otro método resaltable es la espectrometría de masas de ionización química de iones negativos (NICI-MS), que mide la formación de endoperóxidos por ciclación de hidroperóxidos. Esta técnica presenta potencial de monitorización del estrés oxidativo in vivo, pero se pueden producir analitos accidentalmente durante las etapas de manipulación y procesamiento de las muestras (Kinter, 1995; Zhuang et al., 2004).

Tal y como se ha indicado anteriormente, debido a la complejidad del proceso de oxidación de las grasas no existe un único parámetro que permita medir por sí solo todos estos mecanismos de oxidación. Entre los procedimientos más utilizados destacan el índice de peróxidos, para determinar la oxidación únicamente en las primeras etapas del proceso y el índice de *p*-anisidina, que representa una medida de la oxidación secundaria de una grasa. Para determinar el grado de oxidación global de las grasas se desarrolló el índice ToTox o índice de oxidación total, que es la combinación de ambos índices (Hu et al., 2023).

Para la determinación de compuestos volátiles generados durante la oxidación como aldehídos, alcoholes e hidrocarburos volátiles, se utilizan diversas técnicas. La cromatografía de gases con ionización de llama (GC-FID) consiste en un análisis no invasivo de elevada sensibilidad pero que precisa técnicas de muestreo complejas (Kinter, 1995; Nava et al., 2023; Zhang et al., 2020). El método de microextracción en fase sólida acoplada a cromatografía de gases (SPME-GC) es de una precisión elevada y permite el aislamiento y la identificación de un importante número de compuestos de

oxidación secundarios, sin embargo, presenta el inconveniente de ser un método caro y cuyos resultados se ven influenciados por las variaciones de temperaturas (Navarro-García et al., 2004; Tarapoulouzi et al., 2022). La técnica de espectrometría de masas con tubo de flujo de iones selectivo (Selected-ion flow-tube mass spectrometry, SIFT-MS) permite realizar medidas tanto cualitativas como cuantitativas y es muy adecuada para los análisis de muestras de espacio de cabeza, al contrario que para medir la rancidez sensorial (Davis y McEwan, 2007). Por último, la cromatografía de gases en el espacio de cabeza con espectrometría de movilidad de iones (HS-GC-IMS) es una técnica no destructiva, rápida y que no requiere solventes ni genera residuos, pero destaca por su complejidad (Putri et al., 2020; Martín, 2023).

Además de las técnicas mencionadas anteriormente, existen técnicas más novedosas caracterizadas principalmente por ser no destructivas y de respuesta rápida. La técnica que emplea nariz electrónica (Electronic Nose, E-nose) destaca por su facilidad de uso y sus elevadas sensibilidad y productividad, pero también por su baja especificidad (Xu et al., 2016; Karami et al., 2020). El método de espectroscopía NIR hiperespectral se caracteriza por proporcionar información espacial y espectral simultáneamente, sin embargo, la cantidad de datos recogida a través de las imágenes es considerable por lo que se requiere herramientas matemáticas para el análisis de los resultados (Kong et al., 2016; Xia et al., 2016). El análisis por resonancia magnética nuclear espectroscópica (NMR) evalúa satisfactoriamente la rancidez y la oxidación de grasas y aceites pese a que únicamente cuantifica peróxidos con protones hidroperoxi (Liu et al., 2022; Guillén y Goicoechea, 2007; Hwang, 2017; Tarapoulouzi et al., 2022). La técnica de microespectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-MIR) destaca principalmente por ser una técnica analítica versátil y necesitar un número elevado de muestras (Guillén y Goicoechea, 2007; Le Dréau et al., 2009). El equipo de análisis Rancimat permite la realización de ensayos de oxidación acelerados, proporciona información predictiva acerca de la vida útil y opera en amplios rangos de temperatura, sin embargo, se desconoce su utilidad para pruebas de vida útil regulares y sus resultados pueden verse influenciados por la tasa de flujo de aire y el peso de la muestra (Aktar y Adal, 2019; García-Moreno et al., 2013; Farhoosh, 2007; Tarapoulouzi et al., 2022).

3.2. Estudio de la oxidación de aceites marinos

3.2.1. Parámetros químicos indicadores de la oxidación

Con el objetivo de evaluar el impacto del tratamiento térmico sobre la calidad del aceite de bacalao y el aceite de calanus, se estudió el grado de oxidación de cada una de las muestras empleando dos técnicas de análisis, el índice de peróxidos (IP) para la determinación del grado de oxidación primaria, y el índice de *p*-anisidina (VA) para evaluar estados más avanzados de la oxidación u oxidación secundaria. Los aceites fueron almacenados durante un mes a temperatura ambiente y analizados inmediatamente después del tratamiento y a los 7 y 14 días de almacenamientos. Con el objetivo de evaluar el efecto del tratamiento térmico (temperatura de calentamiento y tiempo de tratamiento) y del tiempo de almacenamiento sobre

estos parámetros se llevó a cabo un análisis multifactorial de la varianza (ANOVA multifactorial). Los resultados de este tratamiento estadístico de los datos se muestran en el **ANEXO IV**.

Los valores de índice de peróxidos (IP) de las muestras de aceite de bacalao a lo largo del almacenamiento se muestran en la **FIGURA 1**.

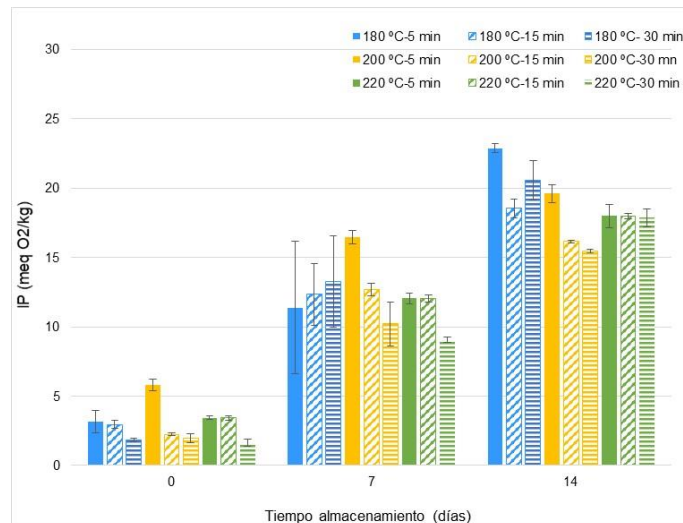


FIGURA 1. Evolución de los valores del índice de peróxidos (IP) de las muestras de aceite de bacalao sometidos a diferentes tratamientos térmicos durante el almacenamiento a temperatura ambiente.

Las muestras analizadas inmediatamente después del tratamiento térmico presentaron en todos los casos valores de IP inferiores a 5 meq O₂/Kg, límite establecido en los parámetros de calidad de los aceites de pescado, aceites de hígado de pescado y aceites de pescado concentrados del CODEX en su Norma para aceites de pescado (CXS 329-2017).

Tal y como se ha comentado en el apartado anterior, el IP es un parámetro empleado para determinar la concentración de compuestos generados durante las etapas iniciales de la oxidación lipídica. Este parámetro está influenciado por la composición de ácidos grasos que constituyen la materia grasa y también correlacionado con la duración o el tipo de almacenamiento (Lawson 1995). Aunque el índice de peróxidos es un indicador que ha sido empleado habitualmente para evaluar la etapa inicial de oxidación, no hay evidencias científicas sobre la correlación de este parámetro con los tratamientos térmicos como la fritura a altas temperaturas (Nayak et al., 2016). Aunque diferentes investigaciones han observado una disminución de los valores de IP durante los procesos de fritura (Zhang et al. 2007), este parámetro puede continuar aumentando después del tratamiento térmico, por lo que IP no se considera un parámetro fiable para determinar el deterioro directo del aceite ocasionado por la fritura (Man y Hussain 1998). Además, se ha observado que el proceso de fritura no produce aumentos sustanciales de los valores de IP porque los peróxidos se descomponen espontáneamente por encima de 150 °C (Marmesat et al. 2010), por lo que el índice de peróxidos no sería un indicador del deterioro causado por el tratamiento térmico sino por las condiciones de enfriamiento y almacenamiento del aceite. Chen et al.

(2014) observaron que el aceite de palma sometido a un proceso de fritura a 150 °C presentaba valores superiores al mismo aceite sometido a 200 °C, mientras que el aumento de la temperatura hasta 250 °C provocó un ligero aumento del valor del IP. Estos resultados podrían explicarse por la descomposición térmica de los hidroperóxidos en compuestos carbonílicos y aldehídos durante la fritura a temperaturas más altas, lo que da como resultado una menor acumulación de estos compuestos en el aceite sometido a temperaturas de fritura más altas. Además, a temperaturas de 80 a 90 °C, la formación de hidroperóxidos va acompañada de una descomposición de estos a un ritmo considerable. Otros estudios se han llevado a cabo para determinar la correlación del IP con los ciclos de fritura (Debnath et al., 2012; Pineda et al., 2011) y el método de calentamiento (Chu y Hsu, 2001).

En general, el valor del índice de peróxidos de las muestras de aceite de bacalao, independientemente del tratamiento térmico aplicado, aumentó significativamente durante el tiempo de almacenamiento ($p < 0,001$), siendo este factor el que tuvo un mayor impacto sobre este parámetro (F-ratio = 781,62). Asimismo, el tiempo de tratamiento y la temperatura de calentamiento afectaron significativamente a la oxidación primaria del aceite. No se encontraron diferencias significativas entre los calentamientos a 180 y 200 °C, siendo estos valores más elevados que los observados en el aceite calentado a 220 °C. Asimismo, los aceites sometidos a altas temperaturas durante 5 min, presentaron valores de IP superiores a los aceites calentados durante 15 o 30 min, independientemente de la temperatura utilizada. Estos resultados confirmarían los resultados obtenidos por otros autores que evidencian, tal y como se ha comentado anteriormente, que un aceite sometido a tratamiento térmico severo podría presentar valores de IP inferiores ya que temperaturas muy elevadas podrían descomponer los hidroperóxidos (Gordon, 2001).

Los valores de *p*-anisidina (VA) de las muestras de aceite de bacalao a lo largo del almacenamiento se muestran en la **FIGURA 2**.

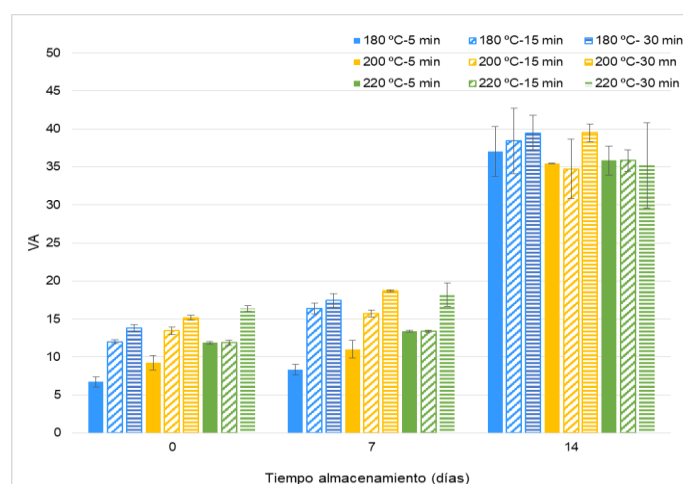


FIGURA 2. Evolución de los valores de *p*-anisidina (VA) de las muestras de aceite de bacalao sometidos a diferentes tratamientos térmicos durante el almacenamiento a temperatura ambiente.

El valor de *p*-anisidina (VA) se define como la cantidad relativa de compuestos de aldehídos insaturados no volátiles formados a partir de los productos de degradación de los hidroperóxidos de las materias grasas. Por ello, el parámetro de la *p*-anisidina se emplea como medida de los productos de oxidación secundaria y se utiliza en lugar de IP o junto con este para evaluar la calidad de aceites sometidos a estrés térmico. Los productos secundarios de la oxidación son más estables que los peróxidos que se forman en las etapas primarias de la oxidación. Este parámetro ha sido utilizado para evaluar la vida útil de los aceites de fritura o para predecir la estabilidad de un aceite durante el almacenamiento (Irwing y Hedges, 2004). Algunos autores han establecido un valor óptimo para los aceites de fritura de 4 y como límite superior de 6 (Gupta, 2005); sin embargo, este valor varía en función del tipo de aceite y sus características. En el caso de los aceites de pescado, aceites de hígado de pescado, aceites de pescado concentrados y ésteres etílicos de aceites de pescado concentrados la Norma para aceites de pescado (CXS 329-2017) del CODEX establece un valor igual a 20 como valor máximo del índice de anisidina (CODEX, 2017).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo mostraron que los valores de VA aumentaron significativamente con el tiempo de almacenamiento, independientemente del tratamiento térmico aplicado ($p < 0,001$). Al igual que en el caso del IP, este factor fue el que tuvo un mayor impacto en el valor de este parámetro (F-ratio = 824,50). La temperatura y tiempo de tratamiento también afectaron al valor de VA del aceite, de forma que, al aumentar la temperatura y duración del tratamiento térmico, el valor de VA aumentó significativamente. En el caso de los tratamientos térmicos, este parámetro aumenta con el tiempo de calentamiento y se nivela después del equilibrio de los compuestos carbonílicos formados con sus productos de degradación. Cuando se ha evaluado el impacto de la fritura sobre este parámetro también se ha observado que este equilibrio se ve favorecido por la transferencia de estos componentes carbonílicos a los alimentos fritos (Aladedunye y Przybylski 2009).

Los valores de IP y de VA de las muestras de aceite de calanus durante el almacenamiento se muestran en las **FIGURAS 3 y 4**. Las muestras de aceite de calanus analizadas tras el tratamiento térmico presentaron valores de IP inferiores a 5 meq O₂/Kg excepto en el caso del aceite de calanus sometido a 200 °C durante 5 min. Este valor se considera el límite máximo admisible para un aceite de pescado con una alta concentración de fosfolípidos (superior a 30%) como el aceite de krill o calanus (CODEX, 2017).

En general, el valor del índice de peróxidos de las muestras de aceite de bacalao, independientemente del tratamiento térmico aplicado, aumentó durante los primeros días de almacenamiento para descender al finalizar el estudio. Este comportamiento se observó para todos los tratamientos térmicos aplicados. En el caso del aceite de calanus el factor “tiempo de almacenamiento” tuvo un menor impacto en el valor del IP, comparado con los resultados obtenidos en el caso del aceite de hígado de bacalao, lo que podría ser debido a la mayor estabilidad de este aceite como consecuencia de su perfil lipídico y gracias a la presencia de compuestos con una alta capacidad antioxidante (F-ratio = 20,10 (**ANEXO IV**)). En este caso, el tiempo

de tratamiento y la temperatura de calentamiento afectaron significativamente a la oxidación primaria del aceite. De nuevo, los aceites sometidos a altas temperaturas durante 5 min, presentaron valores de IP superiores a los aceites calentados durante 15 o 30 min, independientemente de la temperatura utilizada.

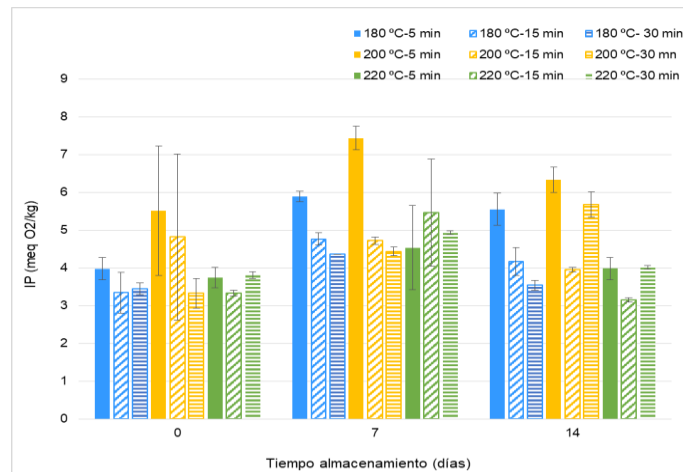


FIGURA 3. Evolución de los valores del índice de peróxidos (IP) de las muestras de aceite de calanus sometidos a diferentes tratamientos térmicos durante el almacenamiento a temperatura ambiente.

Respecto al valor de VA, es interesante destacar que en este caso la temperatura de tratamiento no afectó a los valores de VA de los aceites. De nuevo el factor “tiempo de almacenamiento” fue el que tuvo un mayor impacto en este parámetro. En este caso, el tiempo de tratamiento afectó también significativamente en los resultados finales, de forma que un aumento en el tiempo de tratamiento se correlacionó con valores de VA mayores.

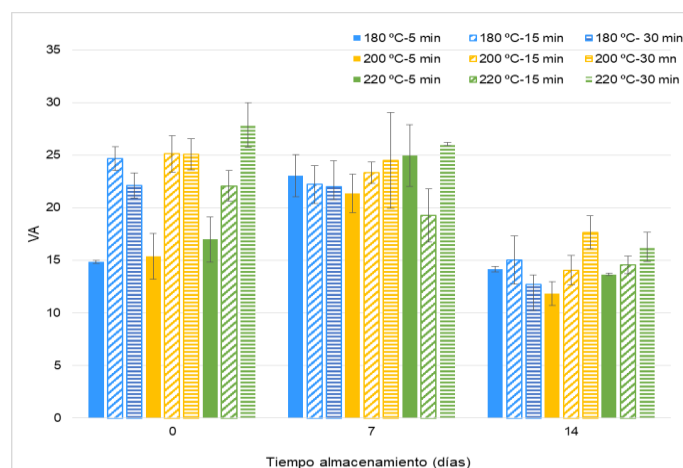


FIGURA 4. Evolución de los valores de *p*-anisidina (VA) de las muestras de aceite de calanus sometidos a diferentes tratamientos térmicos durante el almacenamiento a temperatura ambiente.

La mayor estabilidad de otros aceites de zooplancton (como el aceite de krill) comparada con los aceites de pescado ha sido demostrada en otros

estudios. Thomsen et al. (2013) observaron que durante el almacenamiento el aceite de krill presentó valores prácticamente constantes mientras que durante ese mismo periodo de almacenamiento el valor de IP del aceite de pescado aumentó drásticamente. Asimismo, aunque el valor de VA en general pareció aumentar durante el almacenamiento tanto en el aceite de krill como en aceite de pescado, el VA en el aceite de krill aumentó notablemente menos que en el aceite de pescado.

Finalmente, en el caso del aceite de calanus se observó una mayor variabilidad de los resultados, lo que afecta a la correlación entre los resultados obtenidos en los análisis experimentales y la evaluación de la calidad de los aceites. Estos resultados están alineados con los obtenidos en otros estudios realizados empleando aceite de krill (Lu et al., 2014; Thomsen et al., 2013). En estos trabajos, la medición de los productos de oxidación de lípidos en el aceite de krill mediante técnicas clásicas como IP y VA no proporcionaron una indicación clara de la oxidación de lípidos. Especialmente en el caso del VA, Lu et al. (2014) observaron un patrón de desarrollo errático de este parámetro estableciendo que las técnicas clásicas no son útiles para medir la oxidación de lípidos en el aceite de krill. En este sentido, algunos autores, han establecido que este parámetro no es adecuado para aceites muy coloreados, particularmente aquellos que tienen una alta absorbancia en la longitud de onda empleada en esta determinación. Por tanto, no recomiendan esta prueba para medir la oxidación secundaria en aceites ricos en omega-3 que tienen un color fuerte o que contienen tipos específicos de saborizantes que se agregan a los aceites omega-3. Algunos aceites (por ejemplo, krill o salmón virgen) contienen naturalmente niveles de carotenoides, como la astaxantina, que interfieren con el ensayo VA y producen resultados no válidos (Ismail, et al., 2016; Rubin, 2009). Un informe noruego señaló que se observa interferencia en los aceites de salmón debido al alto contenido de astaxantina.

3.3. Análisis de imagen

3.3.1. Patrones de dispersión láser

El análisis de los patrones de dispersión obtenidos para las muestras del aceite de calanus evidenció el efecto del tratamiento térmico. La **FIGURA 5**, a modo de ejemplo, muestra los patrones láser de dispersión generados por los tres láseres (rojo, verde y azul) al atravesar las muestras control (sin tratamiento) y las tratadas térmicamente durante 30 min a 220 °C. En el caso de la muestra control, solo el láser rojo creó un patrón de dispersión. En el caso de las muestras tratadas térmicamente los patrones fueron creados por los tres láseres. Esto podría deberse a la alteración, como efecto del tratamiento térmico, del pigmento astaxantina que aporta el color rojo característico a este tipo de aceite. Así, en las muestras control, de color rojo intenso, donde el pigmento está inalterado y por tanto elevada su presencia, la luz del láser rojo es capaz de atravesarlas, mientras que los láseres verde y azul son absorbidos por estas. Con el tratamiento térmico, se produce una alteración de los pigmentos, perdiéndose la pureza del rojo, variando el color de los aceites y por tanto reduciéndose la absorción de los láseres verde y azul. Es decir, el aceite estaría actuando como un filtro de luz. Este cambio en

los patrones láser se evidenció cuando se analizaron estadísticamente los espectros obtenidos para cada muestra.

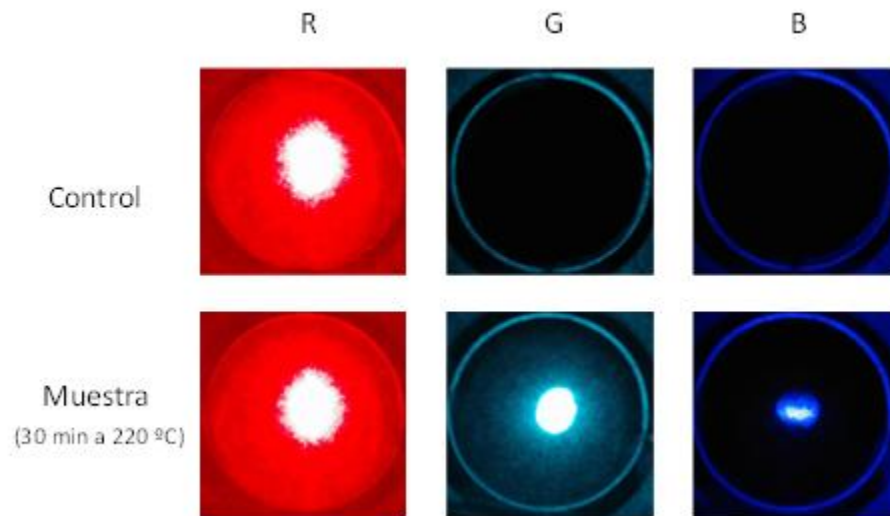


FIGURA 5. Representación de los patrones de dispersión láser (rojo (R), verde (G) y azul (B)) generados al incidir estos sobre dos muestras de aceite de Calanus (control y tratada durante 30 minutos a 220 °C)

La **FIGURA 6a** presenta los valores promedios de la componente 2 (PC2) obtenidos en el estudio de PCA de las muestras de aceite de calanus con y sin tratamiento térmico. En esta figura se puede observar la discriminación de las muestras según el tratamiento térmico aplicado. Así, para todos los tiempos de tratamiento se produjo un incremento del valor de la PC2 con el aumento de la temperatura de tratamiento. Este resultado reflejaría cambios en el aceite de calanus como consecuencia del tratamiento térmico y cómo estos pueden ser capturados y evaluados por la técnica de dispersión láser aplicada. Cuando se evaluó el efecto tiempo de almacenamiento sobre las capturas de imágenes de los aceites de Calanus, los resultados obtenidos no mostraron un efecto significativo de este. Así, cuando todos los datos independientemente del tiempo de almacenamiento fueron evaluados en su conjunto, se siguió evidenciando las diferencias generadas por la intensidad del tratamiento térmico. Como se observa en la **FIGURA 6b**, si bien la tendencia de la PC1 fue inversa a la de la PC2, su interpretación fue la misma, en este caso descendiendo el valor de la PC1 con el incremento del tratamiento térmico.

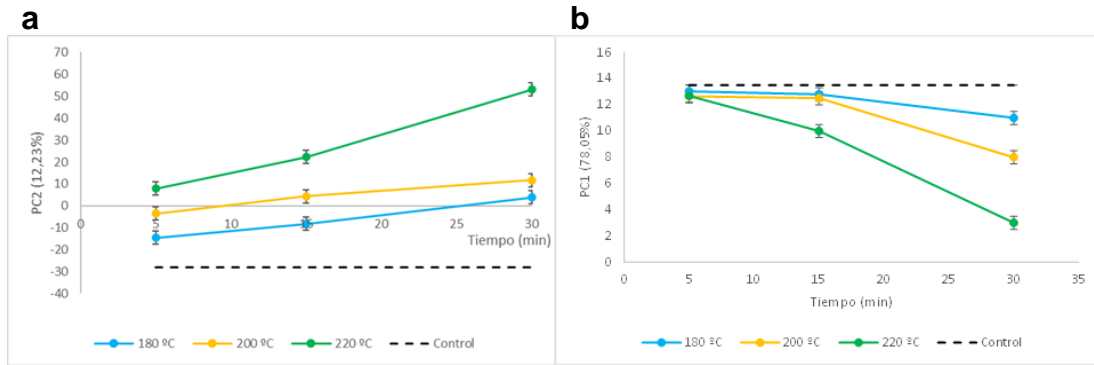


FIGURA 6. Valores promedios de PC2 (a) y PC1 (b) obtenidos en el estudio de PCA de las muestras de aceite de calanus evaluadas mediante la técnica de dispersión láser. Las barras expresan el error estándar tras un análisis ANOVA teniendo en cuenta los factores tiempo y temperatura de tratamiento. Las muestras control no han tenido tratamiento térmico.

A la vista de los resultados observados, empleando la técnica de dispersión láser, el aceite de Calanus podría establecerse que los cambios producidos por el efecto de las altas temperaturas pueden ser captados por el dispositivo, no evidenciándose posteriormente cambios con el tiempo de almacenamiento. Esto implicaría que los cambios como efecto del tratamiento térmico no son influyentes sobre su posterior estabilidad, durante el tiempo estudiado, o bien que el dispositivo de análisis no ha sido capaz de evidenciarlos.

En el estudio de los espectros de dispersión laser de las muestras de aceite de bacalao se observaron resultados parecidos a los anteriores, es decir, se evidenció un efecto del tratamiento térmico, pero no del tiempo de almacenamiento, si bien en este caso la discriminación entre las muestras tratadas fue menor. En la **FIGURA 7** se muestran los valores promedio de la PC2 del estudio de PCA realizado a estas muestras.

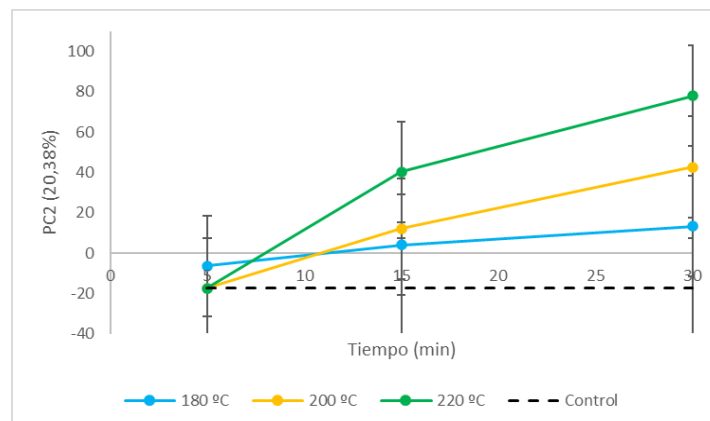


FIGURA 7. Valores promedios de PC2 obtenidos en el estudio de PCA de las muestras de aceite de bacalao evaluadas mediante la técnica de dispersión láser. Las barras expresan el error estándar tras un análisis ANOVA teniendo en cuenta los factores tiempo y temperatura de tratamiento. Las muestras control no han tenido tratamiento térmico.

Como se puede observar, el incremento de la intensidad del tratamiento térmico produjo un incremento de la PC2 si bien estas diferencias fueron en algunos casos no significativas. Este resultado podría estar correlacionado a una mayor estabilidad del aceite de bacalao frente al tratamiento térmico, una menor capacidad del equipo para evaluar los cambios sufridos por el aceite o una combinación de ambos.

Para ambos tipos de aceite (calanus y bacalao), la técnica de dispersión láser ha evidenciado el efecto de la intensidad del tratamiento térmico sobre las características de estos. En el caso del aceite de calanus esta vendría muy marcada por la alteración de algunos compuestos coloreados, como la astaxantina, pero también, al igual que para el aceite de bacalao, por la formación de productos de oxidación secundaria, como aldehídos y cetonas, generados durante los tratamientos térmicos. Estos compuestos tienen actividad óptica entre 400 y 550 nm lo que generaría una mayor alteración de la respuesta de los láser G (550 nm) y B (450 nm). Otros estudios han demostrado que esta actividad óptica es útil para detectar la adulteración con aceite de fritura usado y evaluar la calidad general del aceite de oliva (Guzmán et al., 2015; Hao et al., 2019).

3.3.2. Imágenes multiespectrales

En la **FIGURA 8** se muestran, a modo de ejemplo, las imágenes capturadas por el sistema de análisis de imagen utilizando los diferentes filtros de luz, aplicados a una muestra de aceite de calanus control (sin tratamiento térmico) y una muestra de aceite de calanus sometida a una temperatura de 220 °C durante 3 min. Como se puede observar, para las longitudes de onda estudiadas, se producen diferencias en los tonos RGB de las imágenes, disminuyendo la proporción de la componente roja en las muestras tratadas con respecto a las muestras de aceite control.

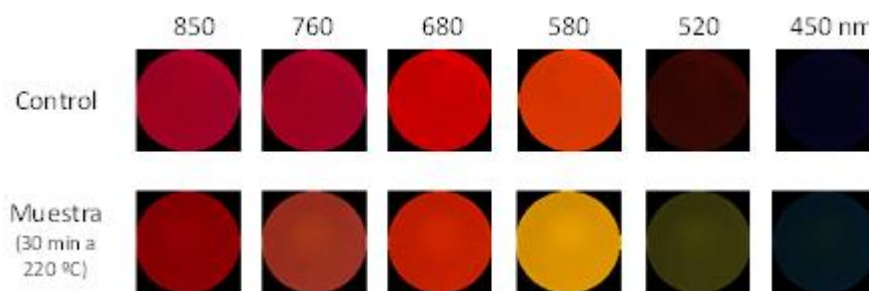


FIGURA 8. Imágenes del Control (sin tratamiento térmico) y del aceite de Calanus sometido a 220 °C durante 30 min, utilizando filtros comprendidos entre los 850 y 450 nm.

Una vez demostrada la capacidad de esta técnica para discriminar entre las muestras de aceite de Calanus, se procedió al estudio detallado de las imágenes obtenidas. Primero se generaron los espectros concatenados de las intensidades de una línea de píxeles de cada imagen y estos se exploraron mediante un análisis de PCA. Como se muestra en la **FIGURA 9**, se registraron diferencias significativas en algunos casos, ligadas al incremento de intensidad, si bien estas fueron de menor índole comparadas con las

obtenidas con la técnica de dispersión láser (**FIGURA 6**). La elevada dispersión de los valores obtenidos, para una misma muestra, afectó significativamente a la discriminación entre muestras. Esto podría deberse a un diseño erróneo en el *setup* del montaje del dispositivo, el cual también podría afectar a los resultados obtenidos en el estudio del aceite de bacalao donde no se observó un efecto del tratamiento térmico ni del tiempo de almacenamiento.

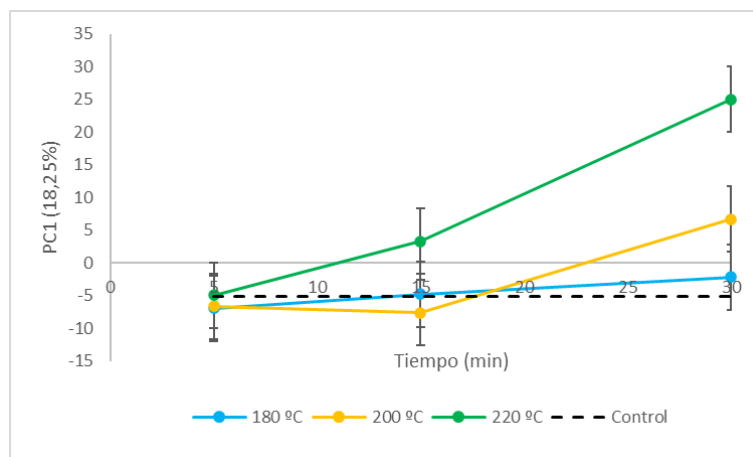


FIGURA 9. Valores promedio de PC1 obtenidos en el estudio de PCA de las muestras de aceite de calanus evaluadas mediante la captura de imágenes utilizando filtros a diferentes longitudes de onda. Las barras expresan el error estándar tras un análisis ANOVA teniendo en cuenta los factores tiempo y temperatura de tratamiento. Las muestras control no han tenido tratamiento térmico.

Los resultados obtenidos en las determinaciones analíticas de los parámetros químicos indicadores de la oxidación primaria y secundaria de las grasas mostraron el avance del estado de oxidación de los aceites marinos durante el almacenamiento, independientemente del tratamiento térmico aplicado. Sin embargo, en las imágenes recogidas de estas muestras no quedan reflejados estos cambios en la calidad de los aceites durante su conservación. Aunque estas técnicas no han sido capaces de detectar la oxidación de los aceites durante el periodo de almacenamiento, sí que han podido discriminar entre los tratamientos térmicos aplicados, lo que podría indicar que se trataría de una herramienta útil para detectar la degradación de los aceites tras su calentamiento.

4. CONCLUSIONES

El estudio de los parámetros químicos indicadores del deterioro de las grasas mostró el avance del estado de oxidación de los aceites marinos durante el almacenamiento, independientemente del tratamiento térmico aplicado. Sin embargo, las técnicas de análisis de imagen no fueron capaces de registrar estos cambios en la calidad de los aceites durante su conservación, por lo que no se considerarían técnicas adecuadas para monitorizar la calidad de estos aceites durante su conservación a temperatura ambiente. La técnica de dispersión láser ha sido capaz de evidenciar el efecto

del tratamiento térmico sobre muestras de aceite de bacalao y Calanus, detectando los cambios producidos como consecuencia del incremento de la temperatura y tiempo de calentamiento. Los resultados obtenidos en el presente estudio señalan el interés de realizar nuevas experiencias con el objetivo de evidenciar cuales son las causas subyacentes a los cambios detectados por las técnicas de análisis de imagen, como podrían ser los cambios en el perfil lipídico, degradación de compuestos de interés, como la astaxantina, o reacciones de pardeamiento.

5. REFERENCIAS

- Aktar, T., Adal, E. (2019). Determining the Arrhenius kinetics of avocado oil: Oxidative stability under rancimat test conditions. *Foods*, 8(7), 236.
- Aladedunye, F. A., Przybylski, R. (2009). Degradation and nutritional quality changes of oil during frying. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 86, 149-156.
- Amft, J., Meissner, P. M., Steffen-Heins, A., Hasler, M., Stöckmann, H., Meynier, A., Schwarz, K. (2023). Interlaboratory study on lipid oxidation during accelerated storage trials with rapeseed and sunflower oil analyzed by conjugated dienes as primary oxidation products. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2300067.
- AOAC Method 965.33. "Peroxide Value of Oils and Fats". Ed. Official Methods of Analysis of AOAC International 16 th Edition, 1997.
- AOCS Official Method C18-90 p-anisidine value.
- Abeyrathne, E. D. N. S., Nam, K., Ahn, D. U. (2021). Analytical methods for lipid oxidation and antioxidant capacity in food systems. *Antioxidants*, 10(10), 1587.
- Chen, Y., Yang, Y., Nie, S., Yang, X., Wang, Y., Yang, M., ... & Xie, M. (2014). The analysis of trans fatty acid profiles in deep frying palm oil and chicken fillets with an improved gas chromatography method. *Food control*, 44, 191-197.
- Choe, E., Min, D. B. (2006). Mechanisms and factors for edible oil oxidation. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 5(4), 169-186.
- Chu, Y. H., Hsu, H. F. (2001). Comparative studies of different heat treatments on quality of fried shallots and their frying oils. *Food chemistry*, 75(1), 37-42.
- CODEX (2017). Norma para aceites de pescado CXS 329-2017 (revisión 2021).
- Cong, S., Dong, W., Zhao, J., Hu, R., Long, Y., Chi, X. (2020). Characterization of the lipid oxidation process of robusta green coffee beans and shelf life prediction during accelerated storage. *Molecules*, 25(5), 1157.
- Davis, B. M., McEwan, M. J. (2007). Determination of olive oil oxidative status by selected ion flow tube mass spectrometry. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(9), 3334-3338.
- Debnath, S., Rastogi, N. K., Krishna, A. G., Lokesh, B. R. (2009). Oil partitioning between surface and structure of deep-fat fried potato slices: A kinetic study. *LWT-Food Science and Technology*, 42(6), 1054-1058.
- Domínguez, R., Pateiro, M., Gagaoua, M., Barba, F. J., Zhang, W., Lorenzo, J. M. (2019). A comprehensive review on lipid oxidation in meat and meat products. *Antioxidants*, 8(10), 429.
- Farhoosh, R. (2007). The effect of operational parameters of the Rancimat method on the determination of the oxidative stability measures and shelf-life prediction of soybean oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 84, 205-209.
- García-Moreno, P. J., Pérez-Gálvez, R., Guadix, A., Guadix, E. M. (2013). Influence of the parameters of the Rancimat test on the determination of the oxidative stability index of cod liver oil. *LWT-Food Science and Technology*, 51(1), 303-308.
- Gordon, M. H. (2001). Measuring antioxidant activity. Dalam Jan Pokorny, Nedyalka, Yanishlieva-Maslarova and Michael Gordon (ed). *Antioxidant in Food, Practical Application*. Woodhead Publishng Ltd. London.
- Guillén, M. D., Goicoechea, E. (2007). Detection of primary and secondary oxidation products by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and ¹H nuclear magnetic resonance (NMR) in sunflower oil during storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(26), 10729-10736.
- Gupta, M. K. (2005). Frying oils. *Bailey's industrial oil and fat products*, 6, 1-31.
- Guzmán, E., Baeten, V., Pierna, J.A.F., García-Mesa, J.A. (2015). Evaluation of the overall quality of olive oil using fluorescence spectroscopy. *Food Chemistry*, 927-394
- Hammond, E. G., White, P. J. (2011). A brief history of lipid oxidation. *Journal of the American Oil*

- Chemists' Society, 88, 891-897.
- Hao, S., Zhu, L., Sui, R., Zuo, M., Luo, N., Shi, J., Zhang, W., He, X., Chen, Z. (2019). Identification and quantification of vegetable oil adulteration with waste frying oil by laser-induced fluorescence spectroscopy. *OSA Contin.*
- Hu, B., Wu, R., Sun, J., Shi, H., Jia, C., Liu, R., & Rong, J. (2023). Monitoring the oxidation process of soybean oil during deep-frying of fish cakes with ¹H nuclear magnetic resonance. *Food Chemistry: X*, 17, 100587.
- Hwang, H. S. (2017). *Advances in NMR spectroscopy for lipid oxidation assessment*. Cham: Springer.
- Irwin, J. W., Hedges, N. (2004). Measuring lipid oxidation. *Understanding and measuring the shelf-life of food*, 289-316.
- Ismail, A., Bannenberg, G., Rice, H. B., Schutt, E., MacKay, D. (2016). Oxidation in EPA-and DHA-rich oils: an overview. *Lipid Technology*, 28(3-4), 55-59.
- Kalmijn, S., Van Boxtel, M. P. J., Ocke, M., Verschuren, W. M. M., Kromhout, D., Launer, L. J. (2004). Dietary intake of fatty acids and fish in relation to cognitive performance at middle age. *Neurology*, 62(2), 275-280.
- Karami, H., Rasekh, M., Mirzaee-Ghaleh, E. (2020). Qualitative analysis of edible oil oxidation using an olfactory machine. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14, 2600-2610.
- Kinter, M. (1995). Analytical technologies for lipid oxidation products analysis. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 671(1-2), 223-236.
- Kong, W., Liu, F., Zhang, C., Zhang, J., Feng, H. (2016). Non-destructive determination of Malondialdehyde (MDA) distribution in oilseed rape leaves by laboratory scale NIR hyperspectral imaging. *Scientific reports*, 6(1), 35393.
- Kuksis, A., Kamido, H., Ravandi, A. (2003). Glycerophospholipid core aldehydes: mechanism of formation, methods of detection, natural occurrence, and biological significance. *Lipid oxidation pathways*, 138-189.
- Landines Parra, M. Ángel, Zambrano Navarrete, J. A. (2009). La oxidación lipídica en la cadena de producción acuícola. *Revista De Investigación Agraria Y Ambiental*, 1, 13-22.
- Lawson, H. W. (1995). *Food oils and fats: technology, utilization and nutrition*. Springer Science & Business Media.
- Le Dréau, Y., Dupuy, N., Gaydou, V., Joachim, J., Kister, J. (2009). Study of jojoba oil aging by FTIR. *Analytica Chimica Acta*, 642(1-2), 163-170.
- Lee, J. H., O'Keefe, J. H., Lavie, C. J., Marchioli, R., Harris, W. S. (2008, March). Omega-3 fatty acids for cardioprotection. In *Mayo Clinic Proceedings* (Vol. 83, No. 3, pp. 324-332). Elsevier.
- Liu, J., Wang, Y. J., Huang, X. Y., Li, X. Z., Ma, C. G., & McClements, D. J. (2022). NMR analysis of lipid oxidation in flaxseed oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(27), 8417-8429.
- Lu, F. S. H., Bruheim, I., Haugsgjerd, B. O., Jacobsen, C. (2014). Effect of temperature towards lipid oxidation and non-enzymatic browning reactions in krill oil upon storage. *Food chemistry*, 157, 398-407.
- Man, Y. C., Hussin, W. W. (1998). Comparison of the frying performance of refined, bleached and deodorized palm olein and coconut oil. *Journal of Food Lipids*, 5(3), 197-210.
- Marmesat, S., Morales, A., Velasco, J., Dobarganes, M. C. (2010). Action and fate of natural and synthetic antioxidants during frying.
- Mori Cortés, N., Lorenzo, G., Califano, A. N. (2019). Influencia del estrés ambiental sobre microemulsiones elaboradas con aceite de pescado. In *V Jornadas de Investigación, Transferencia y Extensión de la Facultad de Ingeniería* (La Plata, 2019).
- Nava, V., Turco, V. L., Licata, P., Panayotova, V., Peycheva, K., Fazio, F., Potorti, A. G. (2023). Determination of Fatty Acid Profile in Processed Fish and Shellfish Foods.
- Navarro-García, G., Bringas-Alvarado, L., Pacheco-Aguilar, R. (2004). Nueva Herramienta para el Estudio de la Oxidación de los Ácidos Grasos, una de las Causas Fundamentales de la Pérdida de Calidad de los Alimentos para la Acuicultura. *Avances en Nutrición Acuícola*.
- Nayak, P. K., Dash, U. M. A., Rayaguru, K., Krishnan, K. R. (2016). Physico-chemical changes during repeated frying of cooked oil: A Review. *Journal of Food Biochemistry*, 40(3), 371-390.
- Pikul, J., Leszczynski, D. E., Kummerow, F. A. (1989). Evaluation of three modified TBA methods for measuring lipid oxidation in chicken meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37(5), 1309-1313.
- Pineda, M. M., Mairal, A. F., Vercet, A., Yagüe, C. (2011). Physicochemical characterization of changes in different vegetable oils (olive and sunflower) under several frying conditions. *CyTA: Journal of food*, 9(4), 301-306.
- Putri, A. R., Aliaño-González, M. J., Ferreiro, M., Setyaningsih, W., Rohman, A., Riyanto, S., Palma,

- M. (2020). Development of a methodology based on headspace-gas chromatography-ion mobility spectrometry for the rapid detection and determination of patin fish oil adulterated with palm oil. *Arabian Journal of Chemistry*, 13(10), 7524-7532.
- Rhee, K. S. (1978). Minimization of further lipid peroxidation in the distillation 2-thiobarbituric acid test of fish and meat. *Journal of Food Science*, 43(6), 1776-1778.
- Rodríguez Vinasco, J. A. (2013). 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 SA).
- Rubio-Hernández, M. (2020). Estudio comparativo de la oxidación en matrices lipídicas de distinta naturaleza: aplicación de TBA y compuestos volátiles.
- Rustad, T. (2009). Lipid oxidation. In *Handbook of seafood and seafood products analysis* (pp. 105-114). CRC Press.
- Segurondo Loza, R., Cortez Quisbert, V. (2020). Determinación de la rancidez en aceites usados en el proceso de frituras en establecimientos de expendio de comida rápida. *Revista Conciencia*, 8(2), 115-128.
- Shahidi, F. (1998). Assessment of lipid oxidation and off-flavour development in meat, meat products and seafoods. *Flavor of meat, meat products, and seafoods*, 373-394.
- Sheron Ramírez, L., Valencia Mecola, Q. (2019). Beneficios para la salud del aceite de pescado. *Ciencia & Desarrollo*, (10), 131-136.
- Stok. (2021, September 2). Diferencias entre el aceite de pescado, el aceite de hígado de bacalao y el omega-3. Möllers.
- Tarapoulouzi, M., Agriopoulou, S., Koidis, A., Proestos, C., Enshasy, H. A. E., Varzakas, T. (2022). Recent advances in analytical methods for the detection of olive oil oxidation status during storage along with chemometrics, authenticity and fraud studies. *Biomolecules*, 12(9), 1180.
- Téllez, G. M., Tápanez, R. H., Gómez, M. D. (2005). Determinación de hidroperóxidos totales en aceite de girasol ozonizado mediante el método de oxidación ferrosa en xilenol naranja. *Grasas y aceites*, 56(2), 147-152.
- Thomsen, B. R., Haugsgjerd, B. O., Griinari, M., Lu, H. F. S., Bruheim, I., Vogt, G., Jacobsen, C. (2013). Investigation of oxidative degradation and non-enzymatic browning reactions in krill and fish oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 115(12), 1357-1366.
- Thomsen, B. R., Yesiltas, B., Sørensen, A. D. M., Hermund, D. B., Glastrup, J., Jacobsen, C. (2016). Comparison of three methods for extraction of volatile lipid oxidation products from food matrices for GC-MS analysis. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 93, 929-942.
- Topkafa, M. (2020). Application of the central composite design and response surface methodology for investigation of induction time, conjugated diene, conjugated triene and trans fatty acid content of corn oil enriched with carotenoids. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 17(12), 3383-3392.
- Valenzuela, Bladimir & Sanhueza Catalán, Julio & D, Fernando. (2012). El aceite de pescado: ayer un desecho industrial, hoy un producto de alto valor nutricional. *Revista chilena de nutrición*. 39. 201-209. 10.4067/S0717-75182012000200009.
- Verdú, S., Fuentes, C., Barat, J. M., & Grau, R. (2022). Characterisation of chemical damage on tissue structures by multispectral imaging and machine learning procedures: Alkaline hypochlorite effect in *C. elegans*. *Computers in Biology and Medicine*, 145,
- Verdú, S., Ruiz-Rico, M., Pérez, A. J., Barat, J. M., Grau, R. (2020). Application of laser backscattering imaging for the physico-chemical characterisation of antimicrobial silica particles functionalised with plant essential oils. *Journal of Food Engineering*.
- Xia, Q., Liu, C., Liu, J., Pan, W., Lu, X., Yang, J., Zheng, L. (2016). Rapid and non-destructive determination of rancidity levels in butter cookies by multi-spectral imaging. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(5), 1821-1827.
- Xu, L., Yu, X., Liu, L., Zhang, R. (2016). A novel method for qualitative analysis of edible oil oxidation using an electronic nose. *Food chemistry*, 202, 229-235.
- Zhang, X., Ning, X., He, X., Sun, X., Yu, X., Cheng, Y., . Wu, Y. (2020). Fatty acid composition analyses of commercially important fish species from the Pearl River Estuary, China. *PLoS One*, 15(1), e0228276.
- Zhang, Y., Xu, W., Wu, X., Zhang, X., Zhang, Y. (2007). Addition of antioxidant from bamboo leaves as an effective way to reduce the formation of acrylamide in fried chicken wings. *Food additives and contaminants*, 24(3), 242-251.
- Zhuang, W., McKague, A. B., Reeve, D. W., Carey, J. H. (2004). Identification of chlorinated fatty acids in fish by gas chromatography/mass spectrometry with negative ion chemical ionization of pentafluorobenzyl esters. *Journal of mass spectrometry*, 39(1), 51-60.

ANEXOS

ANEXO I

Relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible de la Agenda 2030.

Grado de relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS)

Objetivos de Desarrollo Sostenibles	Alto	Medio	Bajo	No Procede
ODS 1. Fin de la pobreza.				X
ODS 2. Hambre cero.				X
ODS 3. Salud y bienestar.	X			
ODS 4. Educación de calidad.				X
ODS 5. Igualdad de género.				X
ODS 6. Agua limpia y saneamiento.				X
ODS 7. Energía asequible y no contaminante.				X
ODS 8. Trabajo decente y crecimiento económico.				X
ODS 9. Industria, innovación e infraestructuras.	X			
ODS 10. Reducción de las desigualdades.				X
ODS 11. Ciudades y comunidades sostenibles.				X
ODS 12. Producción y consumo responsables.				X
ODS 13. Acción por el clima.				X
ODS 14. Vida submarina.				X
ODS 15. Vida de ecosistemas terrestres.				X
ODS 16. Paz, justicia e instituciones sólidas.				X
ODS 17. Alianzas para lograr objetivos.				X

Descripción de la alineación del TFG/TFM con los ODS con un grado de relación más alto.

ODS 3. Salud y Bienestar. Garantizando que los alimentos que llegan a la cadena alimentaria presentan un valor nutricional óptimo y son microbiológicamente seguros.

ODS 9. Industria, innovación e infraestructura. Mediante el desarrollo de nuevas estrategias que permitan a la industria alimentaria reducir el uso de aditivos y realizar un uso más eficiente de los recursos.

ANEXO II

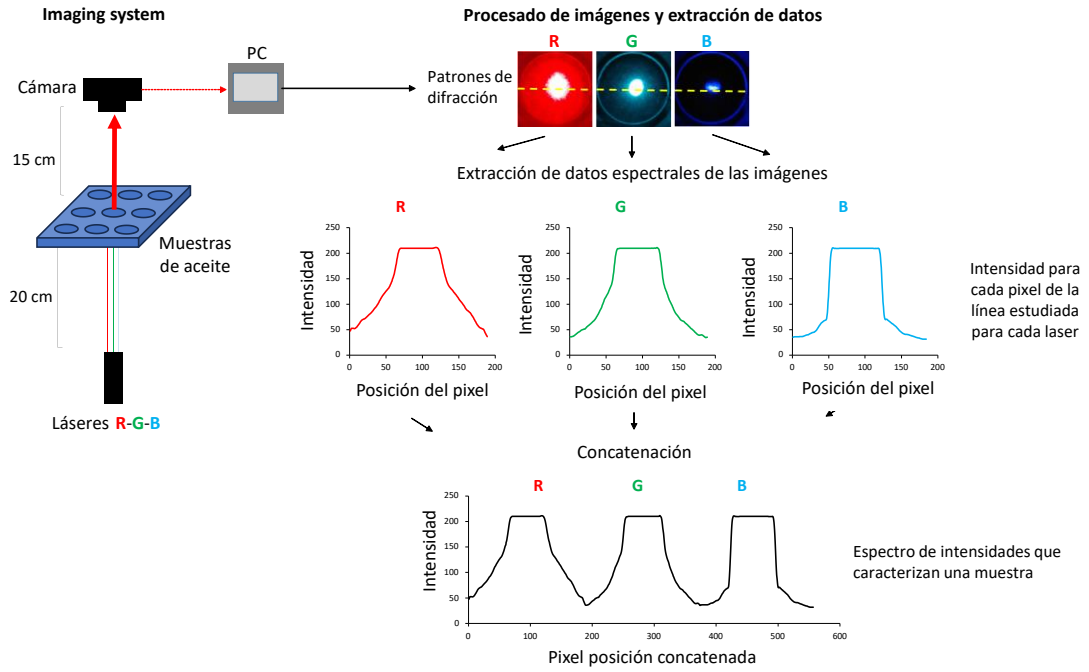


FIGURA II. 1. Esquema del dispositivo de captura de imágenes y procesamiento de datos

ANEXO III

TABLA III.1. Detalles de la revisión bibliográfica realizada sobre las técnicas y parámetros empleados para la evaluación de la oxidación lipídica.

Métodos Análisis	Principio/objetivo	Índice/Valor	Productos analizados	Ventajas	Inconvenientes	Referencia
Índice Peróxidos	Formación de peróxidos por oxidación primaria de ácidos grasos	IP (meq O ₂ /kg)	Aceite de oliva Aceite de palma Aceite de pescado Carne y productos cárnicos	1- Puede ser empleado para establecer el estado de conservación de una grasa 2- Mide los estados iniciales de la oxidación 3- Simplicidad del procedimiento experimental	1- Baja reproducibilidad 2 - Resultados afectados por variaciones ambientales como la temperatura o la luz 3- No recomendado para grasas con elevado grado de insaturación 4- Baja selectividad	Domínguez et al., 2019 Rodríguez, 2013 Tarapoulouzi et al., 2022
Naranja férrico-xilenol (FOX)	Formación de peróxidos por oxidación primaria de ácidos grasos	mmol peróxidos/kg	Carne y productos cárnicos Aceite de girasol ionizado	1- Método más simple y rápido 2- Poco susceptible a la oxidación espontánea 3- Sensibilidad elevada 4- Todavía no se han hallado deficiencias		Domínguez et al., 2019 Téllez et al., 2005
Cromatografía de gases con espectrometría de masas	Formación de hidroperóxidos por oxidación primaria de ácidos grasos		Muestras biológicas Diferentes aceites Leche	1- Sensibilidad mejorada 2- Permite realizar el análisis en muestras que no pueden analizarse mediante otros métodos. 3- Permite el análisis simultáneo	1- Complejos métodos de derivatización 2- Complejo protocolo de análisis 3- Mayor procesamiento de muestras	Kinter, 1995 Thomsen et al., 2016
Tiocianato férrico	Formación de hidroperóxidos por oxidación primaria de ácidos grasos		Aceite de oliva	1- Ampliamente utilizado en la oxidación de lípidos en sistemas de emulsión 2- Método colorimétrico 3- Mejor sensibilidad para la evaluación del deterioro de la grasa que otros métodos fotométricos	1- Depende de la intensidad del cromóforo 2- Elevado precio de los reactivos	Tarapoulouzi et al., 2022

Dienos conjugados	Formación de compuestos conjugados por oxidación primaria de ácidos grasos	μmol/g	Aceite de girasol Aceite de colza Aceite de maíz Aceite de oliva	1- Bien estandarizado 2- Elevada fiabilidad 3- Sin necesidad de equipamiento especial o complejo 4- Marcador oxidativo de elevada sensibilidad 5- Método simple y rápido 6- Menor cantidad de muestra necesaria	1- Resultados afectados por la temperatura 2- Resultados afectados por las condiciones de almacenamiento	Amft et al., 2023 Topkafa, 2020 Tarapoulouzi et al., 2022
Índice de p-anisidina	Formación de aldehídos por oxidación secundaria de ácidos grasos	VA	Diferentes aceites	1- Buen indicador de la oxidación para grasas almacenadas durante períodos de tiempo prolongados 2- Proporciona información sobre el deterioro de los aceites durante procesos de fritura	1- Baja especificidad 2 - Influenciado por factores como: el estado físico de los lípidos, la composición de ácidos grasos y las condiciones de almacenamiento	Tarapoulouzi et al., 2022
Ácido tiobarbitúrico (TBA)	Formación de aldehídos por oxidación secundaria de ácidos grasos	mg MDA/kg	Muestras biológicas Carne de pollo Pescado Aceite de oliva	1- Permite el análisis simultáneo 2- Permite establecer el grado de oxidación de un alimento 3- Sencilla y barata 4- De los métodos más utilizados en la peroxidación de lípidos 5- Elevada fiabilidad	1- Limitaciones para evaluar el estado oxidativo de alimentos complejos 2- No es apropiada para detectar niveles bajos de oxidación 3- Baja reproducibilidad	Kinter, 1995 Pikul et al., 1989 Rhee, 1978 Rubio-Hernández, 2020 Tarapoulouzi et al., 2022
Test de Kreis	Formación de aldehídos por oxidación secundaria de ácidos grasos		Aceites de fritura	1- Mide la calidad de los aceites utilizados 2- Fiabilidad de resultados	1- Método subjetivo 2- Se define por cambio de color	Segurondo y Cortez, 2020 Hammond y White, 2011

Espectrometría de masas de ionización química de iones negativos (NICI-MS)	Formación de endoperóxidos por oxidación secundaria de ácidos grasos		Muestras biológicas Pescado	1- Elevadas sensibilidad y selectividad 2- Potencial de monitorización del estrés oxidativo in vivo	1- Producción accidental de analitos en las etapas de manipulación y procesamiento de muestras 2- Niveles basales altos pueden dificultar la detección de un aumento o disminución de la producción 3- Necesidad de hidrolización de ácidos grasos	Kinter, 1995 Zhuang et al., 2004
Cromatografía de gases con ionización de llama (GC-FID)	Determinación de compuestos volátiles de ácidos grasos		Muestras biológicas Especies de pescados y mariscos	1- Análisis no invasivo en sistemas biológicos 2- Elevada sensibilidad	1- Complejas técnicas de muestreo 2- Problemas asociados con cantidades de hidrocarburos de fondo	Kinter, 1995 Nava et al., 2023 Zhang et al., 2020
Microextracción en fase sólida acoplada a cromatografía de gases (SPME - GC)	Compuestos volátiles por oxidación de ácidos grasos		Aceites vegetales Aceites de pescado	1- Sensibilidad mejorada 2- Monitoreo eficiente de la oxidación lipídica 3- Aislamiento e identificación de un importante número de compuestos de oxidación secundarios 4- Versátil 5- Precisión elevada	1- Necesidad de empleo de diferentes compuestos químicos 2- Resultados influenciados por las temperaturas 3- Técnica relativamente novedosa 4- Método caro	Navarro-García et al., 2004 Tarapoulouzi et al., 2022
Espectrometría de masas con tubo de flujo de iones (SIFT-MS)	Compuestos volátiles por oxidación de ácidos grasos		Aceite de oliva	1- Medidas cualitativas y cuantitativas 2- Muy adecuado para los análisis de muestras de espacio de cabeza 3- Método de análisis simple y rápido	1- Dependientes del tiempo de oxidación 2- No es adecuado para medir la rancidez sensorial 3- Necesidad de ionización química	Davis y McEwan, 2007

Cromatografía de gases en el espacio de cabeza con espectrometría de movilidad de iones (HS-GC-IMS)	Compuestos volátiles por oxidación de ácidos grasos		Aceites de pescado Carne de cerdo	1- Rápido 2- Elevada fiabilidad 3- No requiere solventes ni genera residuos 4- No destructiva 5- No requiere limpieza entre muestras	1- Complejidad de la técnica 2- Método caro	Putri et al., 2020 Martín, 2023
Electronic nose (E-nose)	Grado de oxidación de aceites		Aceites comestibles	1- Facilidad de uso 2- Elevada sensibilidad 3- Elevada productividad 4- De respuesta rápida 5- Técnica no destructiva	1- Caro 2- Baja especificidad	Xu et al., 2016 Karami et al., 2020
Espectroscopía NIR hiperespectral	Contenido de malondialdehído		Aceite de colza Galletas de mantequilla	1- Técnica no destructiva 2- Respuesta rápida 3- Información espacial y espectral simultáneamente	1- Dificultad de almacenamiento y análisis de datos 2- Necesidad de reducción de dimensiones	Kong et al., 2016 Xia et al., 2016
Resonancia magnética nuclear espectroscópica (NMR)	Compuestos de oxidación primaria y secundaria de ácidos grasos		Aceite de linaza Aceite de girasol Aceite de oliva	1- Técnica no destructiva 2- Vinculado a la movilidad molecular 3- Monitorización de la oxidación de grasas y aceites 4- Evalúa con éxito la rancidez y la oxidación 5- Técnica rápida	1- Complejidad de la técnica 2- Únicamente cuantifica peróxidos con protones hidroperoxi 3- Baja sensibilidad	Liu et al., 2022 Guillén y Goicoechea, 2007 Hwang, 2017 Tarapoulouzi et al., 2022
Microespectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-MIR)	Compuestos de oxidación primaria y secundaria de ácidos grasos		Aceite de girasol Aceite de jojoba	1- Técnica no destructiva 2- Técnica analítica versátil 3- Empleada en estados líquidos, sólidos y gaseosos 4- Técnica simple, continua y rápida 5- Monitorización de la oxidación de grasas y aceites	1- Resultados influenciados por las temperaturas y condiciones de almacenamiento 2- Necesidad de instrumental específico 3- Necesidad de número elevado de muestras	Guillén y Goicoechea, 2007 Le Dréau et al., 2009

Rancimat	Evaluar la estabilidad oxidativa de grasas y aceites		Aceite de aguacate Aceite de hígado de bacalao Aceite de soja Aceite de oliva	1- Técnica rápida 2- Realización de ensayos de oxidación acelerados 3- Proporciona información predictiva acerca de la vida útil 4- Permite evaluar la estabilidad oxidativa midiendo el tiempo de inducción de la oxidación 5- Opera en amplios rangos de temperatura	1- Resultados influenciados por la tasa de flujo de aire, el peso de la muestra 2- Se desconoce su utilidad para pruebas de vida útil regulares 3- Solo aplicable para aceites a granel 4- La posible pérdida de componentes volátiles durante el proceso de oxidación proporciona resultados incorrectos	Aktar y Adal, 2019 García-Moreno et al., 2013 Farhoosh, 2007 Tarapoulouzi et al., 2022
Índice TOTOX	Determinación de la oxidación total	ToTox = 2·IP + VA	Aceites comestibles	1- Permite conocer el nivel de oxidación 2- Permite conocer la calidad de una grasa 3- Engloba el grado de oxidación primaria y secundaria 4- Permite comprobar si se cumplen los requisitos de calidad para cada grasa	1- Se calcula a partir de valores de otros índices con unidades diferentes 2- Variable en función del tratamiento empleado 3- Parámetro empírico	Hu et al., 2023

ANEXO IV

TABLA IV.1. Resultados del ANOVA multifactorial (F-ratio^{p-valor}) para los parámetros químicos analizados (índice de peróxidos (IP) y valor de anisidina (VA)), considerando como factores la temperatura de tratamiento (T), el tiempo del tratamiento térmico aplicado (t), el tiempo de almacenamiento (A) y la interacción entre los diferentes factores.

	<i>T</i>	<i>t</i>	<i>A</i>	<i>T x t</i>	<i>T x A</i>	<i>T x A</i>	<i>T x t x A</i>
Bacalao							
<i>IP</i>	9,92***	20,92***	781,62***	4,97**	10,25***	1,46ns	3,29**
<i>AV</i>	11,86***	54,36***	824,50***	1,55ns	9,02***	6,34**	1,06ns
Calanus							
<i>IP</i>	14,58***	18,46***	20,10***	6,03***	1,40ns	1,77ns	2,53*
<i>AV</i>	2,04ns	24,04***	110,08***	6,35**	0,12ns	13,28***	0,99ns

Nivel de significación (α): ***(p-valor<0,001), **(p-valor<0,01), *(p-valor<0,05), ns (no significativo).