

FORMACIÓN DE ÓXIDOS DE COLESTEROL EN EL PROCESO DE  
PREPARACIÓN DEL FRITO PASTUSO

WILSON ALEXANDER ALVAREZ  
LADY VANESA MONTEZUMA

UNIVERSIDAD DE NARIÑO  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES  
DEPARTAMENTO DE QUIMICA  
SAN JUAN DE PASTO  
2014

FORMACIÓN DE ÓXIDOS DE COLESTEROL EN EL PROCESO DE  
PREPARACIÓN DEL FRITO PASTUSO

WILSON ALEXANDER ALVAREZ CASTILLO  
LADY VANESA MONTEZUMA RIASCOS

Trabajo de Grado presentado como requisito parcial para optar al título de  
Químicos

Director:  
JUAN JOSE LOZADA CASTRO.  
Ph. D. Ciencias Químicas

UNIVERSIDAD DE NARIÑO  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES  
DEPARTAMENTO DE QUIMICA  
SAN JUAN DE PASTO  
2014

“Las ideas y conclusiones aportados en la tesis de grado, son responsabilidad exclusiva de los autores”

Artículo 1 del Acuerdo No. 324 de Octubre 11 de 1966, emanado por el Honorable Consejo directivo de la Universidad de Nariño.

Nota de Aceptación

---

---

---

---

Juan José Lozada Castro  
Director

Oswaldo Osorio Mora  
Jurado

David Arturo Perdomo  
Jurado

San Juan de Pasto, Enero de 2014

## AGRADECIMIENTOS

A Dios, porque solo con su consentimiento es posible la realización de toda obra.

Al director de este trabajo de investigación: Juan José Lozada Castro Ph. D., por la asesoría, espacio y el apoyo brindado durante el tiempo de ejecución de la investigación.

A la Vicerectoría de Investigaciones, Posgrados y Relaciones Internacionales de La Universidad de Nariño (VIPRI) por la financiación de este trabajo.

A la Universidad de Nariño por el aporte de los recursos en equipos y personal requeridos para el desarrollo de la investigación y por permitirnos culminar con nuestros estudios de pregrado.

A los profesores del Departamento de Química por haber aportado en la formación académica.

Al Grupo de Investigación Estudios de Sistemas Contaminantes por el apoyo brindado para el desarrollo de esta investigación.

A familiares, amigos y a todas las personas que de alguna manera contribuyeron a la realización de este trabajo de grado.

## DEDICATORIA

*Culminar con una nueva etapa en la vida trae consigo recuerdos del esfuerzo y sacrificio vividos a lo largo del camino, dejando huellas en el corazón difíciles de borrar y nuevos sueños por alcanzar, pero con la guía de Dios siempre habrá la luz al final del túnel.*

*Dedico este trabajo de grado a la memoria de mi abuela Luz Angélica Álvarez por ser un ejemplo de fortaleza y porque fue más que una madre para todos nosotros.*

*A mi padre por ser el pilar de mi vida, la razón de mi existencia y porque sin su apoyo no hubiese culminado mi formación profesional; gracias padre por hacer que cada mañana tenga sentido.*

*A la familia Álvarez por apoyarme incondicionalmente en todas las etapas de la vida y por darme la oportunidad de sentir el calor de hogar que hace de nuestra familia, única.*

Yíyo

*Dedico este trabajo de grado,*

*A Jehová Dios, quien es nuestro padre y guía en todo lo que hacemos.*

*A mis padres, por ser el apoyo incondicional en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, Por ser los ejemplos de perseverancia, por el valor mostrado para salir adelante y más que nada, por su amor.*

*Vanessa M.*

## INDICE

	Pág
INTRODUCCIÓN	21
1 OBJETIVOS	23
2 MARCO TEORICO	24
2.1 Aspectos Generales sobre colesterol	24
2.1.1 Estructura	24
2.1.2 Productos de Oxidación	25
2.1.3 Rutas de síntesis de óxidos de colesterol (COPs)	29
2.1.4 Efectos biológicos de los COPs	34
2.2 Contenidos de colesterol en los insumos del frito pastuso	35
2.2.1 Colesterol en carne de cerdo	35
2.2.2 Frito pastuso	36
2.3 Análisis bromatológico para determinar parámetros relacionados con la formación de COPs	37
2.4 Técnicas cromatográficas para análisis de COPs	38
2.4.1 Generalidades sobre cromatografía	38
2.4.1.1 Cromatografía de adsorción	38
2.4.1.2 Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)	39
2.5 Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) aplicada para el Análisis de COPs	40
3 METODOLOGIA	41
3.1 Descripción de reactivos	41
3.1.1 Estándares	41
3.1.2 Disolventes	41
3.1.3 Otros reactivos	41
3.2 Materiales y equipos	41

3.2.1 Materiales	41
3.2.2 Equipos cromatográficos	42
3.2.2.1 Cromatógrafo líquido de alta eficiencia (HPLC)	42
3.3 Desarrollo del método	43
3.3.1 Preparación de las disoluciones estándar de trabajo	43
3.3.1.1 Solución estándar de colesterol	43
3.3.1.2 Solución estándar de 7-Cetocolesterol	43
3.3.1.3 Solución estándar de 6-Cetocolesterol	43
3.3.1.4 Solución estándar de 25-Hidroxicolesterol	43
3.3.2 Calibrados	43
3.3.2.1 Solución de COPs para el calibrado de HPLC	43
3.4 Montaje de la técnica por HPLC	44
3.4.1 Revisión del método cromatográfico	44
3.4.1.1 Linealidad	44
3.4.1.2 Selectividad	45
3.4.1.3 Precisión	45
3.4.1.3.1 Repetibilidad	45
3.4.1.3.2 Reproducibilidad	46
3.4.1.4 Límites de confianza	46
3.4.1.5 Exactitud	46
3.4.1.6 Sensibilidad	46
3.5 Diseño experimental para análisis de COPs	48
3.5.1 Condimentos utilizados	50
3.5.2 Hipótesis	51
3.5.3 Muestras	51
3.6 Determinación de parámetros característicos de la muestra	52
3.7 Preparación de muestras para la determinación de COPs	52
3.7.1 Lixiviación	52
3.7.2 Extracción en fase sólida (SPE)	53

3.7.3 Determinación de colesterol en muestras de alimentos	54
3.7.4 Determinación de COPs en muestras de alimentos	55
3.7.5 Preparación de muestras en aceite vegetal	55
3.7.6 Preparación de muestras en grasa de cerdo	55
3.8 Preparación de muestras para análisis de COPs por GC/MS	55
3.8.1 Derivatización con Tri-sil	55
3.9 Cromatógrafo de gases-espectrómetro de masas	56
3.10 Análisis estadístico	56
3.10.1 Anova del diseño experimental	56
3.10.2 Análisis de correlación, COPs Parámetros cromatográficos	56
4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	57
4.1 Etapas del método	57
4.1.1 Condiciones cromatográficas	57
4.1.2 Evaluación del método	57
4.1.2.1 Curvas de calibración	58
4.1.2.2 Límites de detección y cuantificación	60
4.1.2.3 Precisión y límites de confianza	61
4.1.2.4 Recuperación	63
4.2 Parámetros característicos de la carne de cerdo	63
4.3 Niveles de colesterol y COPs en insumos y frito pastuso	65
4.3.1 Colesterol en materias primas	65
4.3.2 COPs en materias primas	66
4.4 Cuantificación de colesterol y COPs en frito pastuso	68
4.4.1 Contenidos de colesterol en frito pastuso	69
4.4.2 Contenidos de COPs en frito pastuso	71
4.4.2.1 Preparación	73
4.4.2.2 Tipo de aceite	75
4.4.2.3 Pieza de carne de cerdo	77
4.5 Identificación de COPs por GC/MS	79

4.6 Efecto de factores en la formación de COPs	81
4.7 Análisis de correlación	84
CONCLUSIONES	87
RECOMENDACIONES	88
BIBLIOGRAFIA	89
ANEXOS	94

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág
FIGURA 1: Posición del colesterol entre las moléculas de fosfolípidos en la membrana celular y sus estructuras.	24
FIGURA 2: Principales óxidos de colesterol	26
FIGURA 3: Oxidación del colesterol	28
FIGURA 4: Estructura del colesterol	29
FIGURA 5: Principales rutas de síntesis de COPs en carnes y derivados	30
FIGURA 6: Productos de la autooxidación del colesterol	32
FIGURA 7: Fotooxidación del colesterol	33
FIGURA 8: Cortes de la carne de cerdo clasificación por contenido graso	36
FIGURA 9: Elución de una muestra por cromatografía de adsorción (SPE)	39
FIGURA 10: Cromatógrafo líquido de alta eficiencia, HPLC	42
FIGURA 11: Efecto del agua en la formación de COPs	49
FIGURA 12: Proceso de lixiviación	53
FIGURA 13: Filtración del extracto de cloroformo	53
FIGURA 14: Cartuchos usados para extracción en fase sólida	54
FIGURA 15: Extracto final de COPs sin ACN	54
FIGURA 16: Extractos de colesterol y COPs disueltos en IPA y ACN	55
FIGURA 17: Cromatograma de la mezcla de estándares a 205 y 238 nm	57
FIGURA 18: Cromatogramas de colesterol en materias primas	66

FIGURA 19: Cromatograma de COPs y estándar en grasa de cerdo	67
FIGURA 20: Colesterol en frito pastuso y estándar	71
FIGURA 21: Cromatograma de COPs, experimento C2 y estándar	74
FIGURA 22: Cromatograma de 7-Cetocolesterol y estándar para muestras F y D	76
FIGURA 23: Cromatograma de 7-Cetocolesterol y estándar para muestras B, J, G y A	78
FIGURA 24: Cromatograma de 7-Cetocolesterol tri-sil derivado para carne costilla cruda	80
FIGURA 25: Cromatograma de 25-Hidroxicolesterol tri-sil derivado para carne costilla cruda	81

## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág
TABLA 1: Características de los COPs	27
TABLA 2: Valores medios de algunos parámetros bromatológicos en carne de cerdo cruda	37
TABLA 3: Especificaciones de la técnica cromatográfica, HPLC para análisis de colesterol y COPs	42
TABLA 4: Volúmenes de la mezcla de patrones	44
TABLA 5: Parámetros cromatográficos	48
TABLA 6: Factores y niveles para análisis de COPs	50
TABLA 7: Cantidad de adobo utilizado en la preparación de frito pastuso para 1 Kg de carne	50
TABLA 8: Diseño experimental con dos experimentos centrales	51
TABLA 9: Clasificación de cada nivel del diseño experimental	51
TABLA 10: Análisis bromatológico	52
TABLA 11: Condiciones cromatográficas, HPLC en fase reversa para análisis de COPs	57
TABLA 12: Parámetros de caracterización de los picos cromatográficos	58
TABLA 13: Ecuaciones para la curva de calibración y factores de linealidad para Colesterol y COPs	60
TABLA 14: Límites de detección y límites de cuantificación	61
TABLA 15: Repetitividad de los COPs	62
TABLA 16: Reproducibilidad de los COPs	62

TABLA 17: Porcentajes de recuperación	63
TABLA 18: Parámetros bromatológicos de carne de cerdo cruda	64
TABLA 19: Parámetros bromatológicos de frito pastuso	64
TABLA 20: Concentración de colesterol en materias primas	66
TABLA 21: Concentración de COPs en materias primas	68
TABLA 22: Clasificación de experimentos en la preparación de frito pastuso	69
TABLA 23: Concentración de colesterol en frito pastuso	70
TABLA 24: Concentración de COPs en frito pastuso	73
TABLA 25: Relación m/z de los COPs tri-sil derivados y sus iones de fragmentación obtenidos de los espectros de masas	80
TABLA 26: Concentración de COPs por factores	82
TABLA 27: Análisis de varianza para diseño experimental	82
TABLA 28: Matriz de correlación de parámetros bromatológicos y 7-Cetocolesterol	84
TABLA 29: Matriz de correlación de factores y 7-Cetocolesterol	85
TABLA 30: Parámetros estadísticos en la cuantificación de colesterol en insumos (anexo C)	96
TABLA 31: Parámetros estadísticos cuantificación de colesterol en frito pastuso (anexo C)	97
TABLA 32: Parámetros estadísticos en la cuantificación de COPs en materias primas (anexo D)	99
TABLA 33: Parámetros estadísticos en la cuantificación de COPs en frito pastuso (anexo D)	100

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

	Pág
GRÁFICO 1: Curva de calibración para COPs	59
GRÁFICO 2: Curva de calibración para colesterol	59
GRÁFICO 3: Diagrama de medias para 7-Cetocolesterol por preparación	75
GRÁFICO 4: Diagrama de medias para 7-Cetocolesterol por tipo de aceite	77
GRÁFICO 5: Diagrama de medias para 7-Cetocolesterol para humedad	79
GRÁFICO 6: Diagrama de Pareto estandarizado para 7-Cetocolesterol	83
GRÁFICO 7: Diagrama de Residuos para 7-Cetocolesterol	83
GRÁFICO 8: Diagrama de dispersión de la matriz de correlación de parámetros bromatológicos 7-cetocolesterol	85
GRÁFICO 9: Diagrama de dispersión de la matriz de correlación de factores y 7-Cetocolesterol	86

## ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág
ANEXO A: Cálculo de porcentajes de recuperación	94
ANEXO B: Cuantificación de colesterol en materias primas y frito pastuso	95
ANEXO C: Cuantificación de COPs en materias primas y frito pastuso	98
ANEXO D: Tablas ANOVA por factor del diseño experimental	101
ANEXO E: Artículo científico	102

## ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

ACN	Acetonitrilo
ANOVA	Análisis de varianza
C <sub>8</sub>	Octilsilano
CHCl <sub>3</sub>	Cloroformo
Clean up	Proceso de limpieza de las muestras
CV	Coeficiente de variación
COPs	Productos de oxidación del colesterol
DCA	Diseño completamente aleatorizado
ET20	Éter dietílico
GC	Cromatografía de gases
GC-MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
Gs	Grasa de cerdo, Manteca de Cerdo
Ha	Humedad alta
Hm	Humedad media
Hb	Humedad baja
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
Hex	Hexano
HPLC-UV	Cromatografía líquida de alta eficacia con detección ultravioleta
IPA	Isopropanol
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
ND	No Detectado
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sulfato de sodio
P1	Preparación 1
P2	Preparación 2
P3	Preparación 3
R <sub>2</sub>	Coeficiente de determinación
r <sub>2</sub>	Coeficiente de regresión
RSD	Desviación estándar relativa
SD	Desviación estándar
SPE	Extracción en fase sólida
Tri-Sil	Reactivo derivatizante
UHT	Ultra alta temperatura
Vn	Aceite vegetal nuevo
Vr	Aceite vegetal reutilizado
25-OH	25-hidroxicolesterol
6-ceto	6-cetocolesterol
7-ceto	7-cetocolesterol

## RESUMEN

Se determinó la formación de 5-colesten-3 $\beta$ ,25-diol(25-hidroxicolesterol), 3 $\beta$ -hidroxi-5 $\alpha$ -colesten-6-ona (6-Cetocolesterol) y 3 $\beta$ -hidroxi-5 $\alpha$ -colesten-7-ona(7-Cetocolesterol), en el proceso de preparación de frito pastuso (alimento típico de Nariño, Colombia), mediante SPE y HPLC-UV en fase reversa. Se incluyeron los factores: receta de preparación, tipo de grasa o aceite utilizado y tipo de carne de cerdo, por medio de diseño experimental completamente aleatorizado (DCA) y tres niveles en cada caso, se realizaron 10 ensayos por duplicado y para verificar la reproducibilidad de los resultados se incluyeron dos bloques, la experimentación se aplicó a los diferentes insumos utilizados para la preparación y al frito pastuso listo para el consumo. El 7-Cetocolesterol estuvo presente en la mayoría de las muestras; con los niveles más altos en las muestras de los experimentos donde se utilizó: carne de costilla, grasa de cerdo y la receta de fritura directa de la carne, los niveles más bajos se encontraron para los experimentos donde se utilizó lomo y pierna, aceite reutilizado y preparaciones en las que se sometió la carne a cocción en agua y posterior fritura respectivamente. Las desviaciones estándar relativa fueron inferiores al 4,76% y en todos los casos los resultados obtenidos fueron reproducibles.

## ABSTRACT

It determined the formation of 5-cholesten-3 $\beta$ ,25-diol (25-hydroxycholesterol), 3 $\beta$ -hydroxy-5 $\alpha$ -cholesten-6-one (6-ketocholesterol) and 3 $\beta$ -hydroxy-5 $\alpha$ -cholesten-7-one (7-ketocholesterol) in the formation of Frito Pastuso (typical food of Nariño, Colombia), by SPE and HPLC-UV reversed phase. Factors included: recipe preparation, type of fat or oil used and the type of pork, experimental design through DCA and three levels in each case, were performed 10 tests in duplicate and completely randomized to verify the reproducibility of the results two blocks, applied to different inputs for the preparation and the food ready for consumption. 7-ketocholesterol was present in most samples, with highest levels in the samples of experiments where we used: rib meat, pork fat and the recipe directly frying meat, lower levels found for the experiments where it was used back and leg, and reused oil preparations in which the meat is subjected to cooking in water and subsequent frying respectively. Relative standard deviations were less than 4.76% and in all cases the results were reproducible.

## INTRODUCCIÓN

El colesterol es uno de los lípidos que se sintetiza en todos los tejidos animales, en los humanos, una cantidad muy variable de este compuesto se incluye en la dieta contribuyendo en su concentración total. Este compuesto es de gran importancia para el organismo, debido a que es el precursor de hormonas esteroideas y por su estructura planar rígida contribuye a la estabilización de la estructura de la membrana celular<sup>1</sup>; además, el colesterol es susceptible de sufrir reacciones de oxidación en presencia de oxígeno, luz, iones metálicos y de otras sustancias capaces de generar compuestos como los lipoperóxidos que generan los subproductos indeseados de oxidación llamados COPs<sup>2</sup>.

Los alimentos de consumo diario de origen animal como las carnes, dependiendo del tipo de preparación por calentamiento, fritura y las condiciones de almacenamiento como el secado spray, desecación, tratamientos UHT, irradiación, etc., pueden formar cantidades de oxisteroles (COPs) en rangos que van de 80 a 1200 ppm, esto es muy variable, dependiendo del producto, del proceso a que fue sometido, del tipo y tiempo de embalaje, las reacciones de autooxidación del colesterol dan lugar a una amplia gama de COPs más de 60 compuestos debido a la complejidad de la molécula del colesterol<sup>3,4</sup>; de los cuales ocho son los más estudiados: 7 $\alpha$ -hidroxicolesterol, 7 $\beta$ -hidroxicolesterol 7-cetocolesterol, 20 y 25-hidroxicolesterol, 5, 6 $\alpha$ -epoxicolesterol, 5,6 $\beta$ -epoxicolesterol y colestanoetriol, estos COPs<sup>5,6</sup> se les atribuye efectos nocivos para la salud como por ejemplo actividad cito-tóxica en diversas líneas celulares, inducción de apoptosis celular, efectos mutagénicos y carcinógenos entre otras<sup>7</sup>.

El frito pastuso (carne de cerdo frita), es un plato típico del Departamento de Nariño, muy importante en la dieta, por su contenido nutricional y su fácil accesibilidad, siendo un alimento susceptible a la formación de COPs porque

---

<sup>1</sup> Bohinski. Bioquímica. (5ª ed). Ed. Adisson Wesley Iberoamericana. Delawere, USA. 1991

<sup>2</sup> Nawar W. Lipids: en Food Chemistry. Ed Fenema O.R. Marcel Dekker. New York. 1985.

<sup>3</sup> An. R. Acad. Nac. Farm., Óxidos de colesterol en alimentos cocinados con presencia habitual en nuestra dieta 2007, 73 (4): 1159-1174

<sup>4</sup> Pie J., Spahis k., Seillan C. Evaluation of oxidative degradation of colesterol in food and food ingredients: identification and cuantificación of cholesterol oxides. J agric. Food chem. 1990. 38. 973-979

<sup>5</sup> Zhou, Q.; Wasowicz, E.; Handler, B.; Fleisher, L. Y Kummerov, F.A. An excess concentration of oxysterols in the plasma is cytotoxic to cultured endothelial cells. Atherosclerosis (2000) 149: 191-197.

<sup>6</sup> García-Cruset, S.; Carpenter, K.L.; Guardiola, F.; Stein, B.K. Y Mitchinson, M.J. Oxysterols profiles of normal human arteries, fatty streaks and advanced lessions. Free Radical Res. (2001) 53(1): 31-41.

<sup>7</sup> Valenzuela A., Sanhueza J., Nieto S. Oxidos de colesterol (oxisteroles): factores que condicionan su formación, efectos biológicos, y su presencia en alimentos. Rev Chil Nutr. 2002. Vol. 29, N°2.

presenta cantidades elevadas de colesterol, la cual depende del tipo de preparación, los ingredientes y tiempo de preparación.

En este proyecto se realizó el estudio para determinar la formación de óxidos de colesterol en la preparación tradicional de la carne de cerdo frita (frito pastuso), estudiando los factores que influyen en su formación (tipo de preparación, tipo de aceite usado y tipo de carne). Para la extracción de COPs se utilizó el método de lixiviación con cloroformo como solvente, la limpieza de las muestras se realizaron con extracción en fase sólida (SPE) y el análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia, HPLC.

## 1. OBJETIVOS

### 1.1 OBJETIVO GENERAL

Identificar y cuantificar los Óxidos de Colesterol (COPs) formados en el proceso de preparación del frito pastuso.

### 1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Separar, identificar y cuantificar los COPs presentes en los insumos para la preparación del frito pastuso por técnicas cromatográficas.
- Separar, identificar y cuantificar los COPs presentes en el frito pastuso por técnicas cromatográficas.
- Identificar los factores químicos determinantes en la formación de COPs en el frito pastuso.

## 2. MARCO TEÓRICO

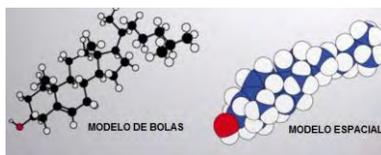
### 2.1 Aspectos Generales Sobre el Colesterol

#### 2.1.1 Estructura y Síntesis

El colesterol (5-colestene-3 $\beta$ -ol) es un esteroide de origen animal que cumple numerosas funciones metabólicas: constituye la estructura básica para la formación de las hormonas esteroideas y las sales biliares que cumplen un rol importante en la digestión y absorción de las grasas en el tracto digestivo, posee importantes funciones regulatorias en el metabolismo intracelular de los ácidos grasos y es, junto con los fosfolípidos, uno de los componentes más importantes de las membranas celulares (citoplasmática, nuclear y de organelos)<sup>8</sup>. De hecho, se estima que cada dos o tres moléculas de fosfolípidos que forman la matriz lipídica de las membranas, existe una molécula de colesterol. Es por estas razones que los organismos animales poseen la capacidad de biosintetizar colesterol prácticamente en todas sus células, siendo también la razón de por qué nuestra dieta debe contener una cierta cantidad de colesterol.

Es importante destacar la importancia de este compuesto en el metabolismo animal, ya que en estudios realizados en ratas, la alimentación experimental con dietas totalmente carentes de colesterol produce en las crías efectos teratogénicos como el nacimiento de animales cíclopes o sin abertura buco-nasal.<sup>9,10</sup>

Figura 1: Posición del colesterol entre las moléculas de fosfolípidos en la membrana celular y sus estructuras<sup>11</sup>



Fuente: Sevanian, A; Peterson, A. Citotoxicidad y propiedades mutagénicas del colesterol. 2002.

<sup>8</sup> Bohinski. Op.cit., p.324

<sup>9</sup> Boissonneault, G.A., Heiniger, H. 25-hydroxycholesterol-induced elevation in Ca uptake: correlation with depressed DNA synthesis, J Cell Physiol 1994; 120: 151-156.

<sup>10</sup> Boissonneault, G.A., Heiniger, H. 25-hydroxycholesterol-induced elevation in <sup>45</sup>Ca uptake- permeability changes in P815 cells. J Cell Physiol 1995; 125: 471-475.

<sup>11</sup> Sevanian, A. Y Peterson, A.R. The cytotoxic and mutagenic properties of cholesterol oxidation products. Food Chem Toxicol. 2000. 24(10-11): 1103-1110.

### 2.1.2 Productos de oxidación

Durante los procesos de fabricación, preparación o bien de almacenamiento de algunos alimentos pueden producirse ciertos productos de peroxidación lipídica que podrían resultar perjudiciales para la salud. Efectivamente, el colesterol y otros lípidos pueden sufrir un mecanismo de autoxidación al ser expuestos al calor, la luz y el aire, mediante la formación de radicales libres con producción de hidroperóxidos que al descomponerse, forman productos secundarios de oxidación. El proceso se ve facilitado en alimentos que contienen hierro o cobre (como carnes y crustáceos), debido al efecto catalítico que ejercen estos elementos traza sobre la oxidación de las grasas<sup>12</sup>.

Se denominan COPs u oxisteroles a los productos de oxidación del colesterol, de los cuales se han identificado más de 60 compuestos, siendo algunos de los más frecuentes: 7 $\alpha$ -hidroxicolesterol, 7 $\beta$ -hidroxicolesterol, 7-cetocolesterol, colestanoetriol, 25-hidroxicolesterol, 20 $\alpha$ -hidroxicolesterol, etc.<sup>13</sup>

Los COPs son absorbidos en el tracto gastrointestinal y al igual que ocurre con el colesterol endógeno en el organismo, son transportados en la sangre, en su mayoría, por las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y de muy baja densidad (VLDL), para luego ser depositados en la pared arterial, donde son citotóxicos causando problemas de salud como las LDL nativas.<sup>14</sup>

El principal origen dietético de los COPs son los aceites, grasas y los alimentos de origen animal fritos en ellos como las patatas y comidas rápidas fritas. Los huevos en polvo también pueden contener gran proporción de compuestos oxidados, ya que para su obtención mediante desecación y pulverización deben someterse a altas temperaturas<sup>15</sup>. Asimismo, se pueden producir óxidos de colesterol durante la preparación industrial de galletas y pasteles. Los productos lácteos en general son resistentes a la autoxidación, aunque ésta puede aumentar si el tiempo de conservación se prolonga; en fórmulas infantiles se han encontrado pequeñas trazas<sup>16</sup>. Son poco frecuentes en carnes frescas, excepto en vísceras, como

---

<sup>12</sup> GIL M. Bañón S., Laencina J., Garrido M. Oxidación del colesterol en carne y derivados: factores que determina su formación. Área de Tecnología de Alimentos. Universidad de Murcia. Facultad de Veterinaria. Campus Universitario. AN. VET. 2004. 20: 21-34.

<sup>13</sup> Kubow, S. Routes of formation and toxic consequences of lipid oxidation products in foods. Free Rad Biol Med 1992; 12: 63-81.

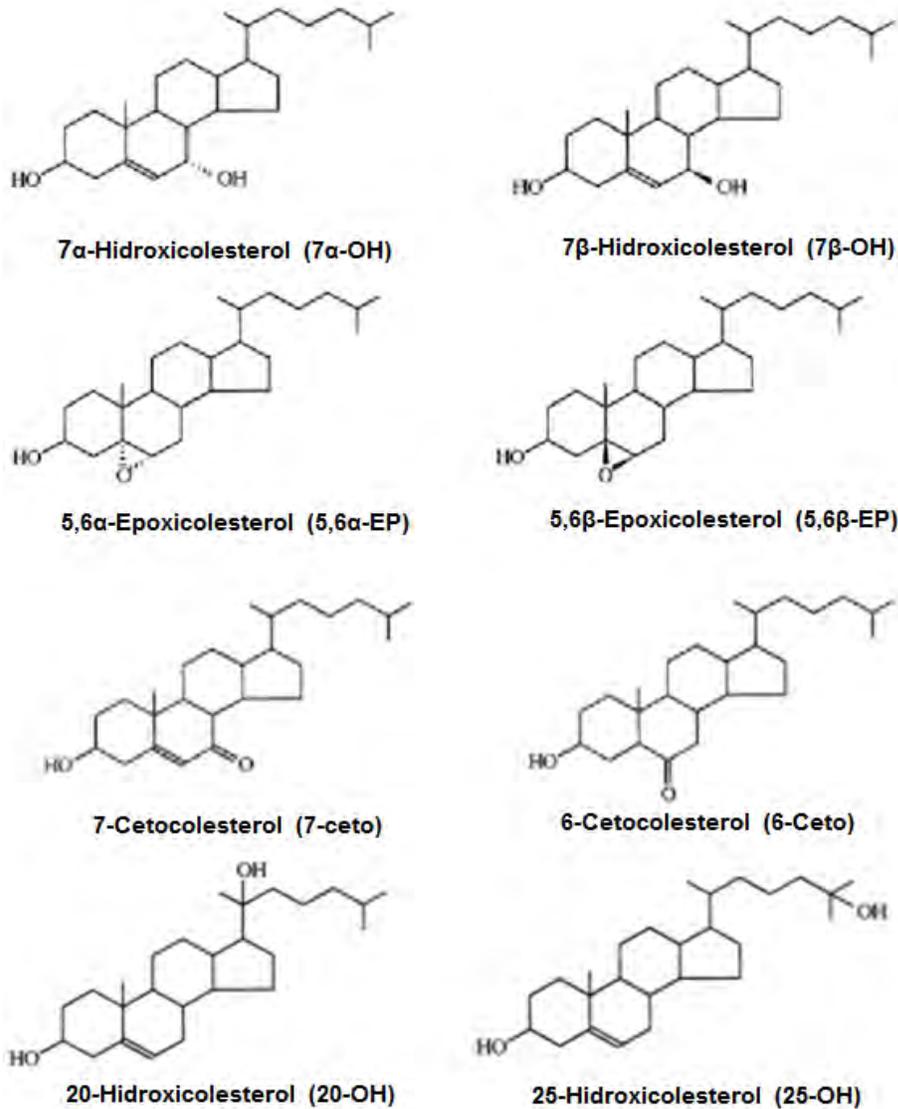
<sup>14</sup> Ibid., p32

<sup>15</sup> Kumari, A. Cholesterol oxidation products-analytical methods and levels in sweets containing heated butter oil. Tesis. Lantbruks university. 108 p.

<sup>16</sup> Valenzuela A. Sanhueza J. Nieto S. Digestión, absorción y transporte de los ácidos grasos: ¿Cuánto es utilizable desde el punto de vista nutricional? Rev Chil Nutri 2001; 28: 396-405.

hígado y cerebro. Sin embargo, sí se producen en productos cárnicos cocinados, congelados, etc., dependiendo de los tiempos de cocción y del procedimiento de conservación utilizado. Se considera que el aporte diario de oxisteroles procedentes de la carne es sólo del 0,5 al 1% del colesterol total de la dieta.<sup>17</sup>

Figura 2: Principales óxidos de colesterol<sup>18</sup>

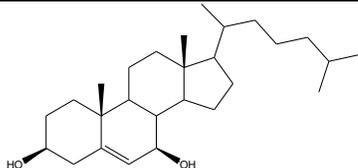
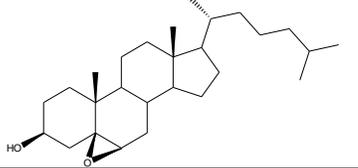
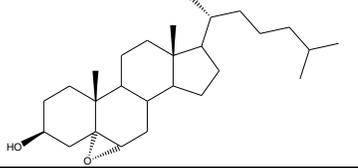
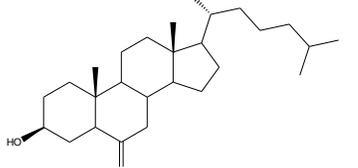
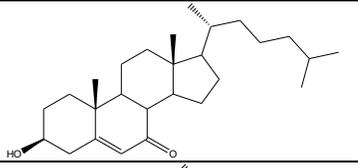
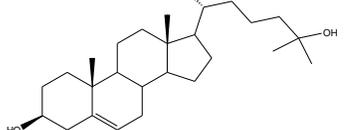


Fuente: Kumari, A. Cholesterol oxidation products-analytical methods and levels in sweets containing heated butter oil..2005

<sup>17</sup> Ibid., p 56

<sup>18</sup> Kumari, A. Op. Cit., p 25

Tabla 1. Características de los COPs<sup>19</sup>

Nombre completo	Nombre corto	Estructura	Masa molecular
7 $\beta$ -hidroxicolesterol	7 $\beta$ -OH		402,65
Colesterol 5 $\beta$ ,6 $\beta$ -epóxido	$\beta$ -epoxide		402,65
Colesterol 5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -epóxido	$\alpha$ -epoxide		402,65
6-cetocolestanol	6-ceto		402,65
7-cetocolesterol	7-ceto		400,64
25-hidroxicolesterol	25-OH		402,65

Fuente: Lozada-Castro J.J. Determinación de COPs en muestras de alimentos. 2012.

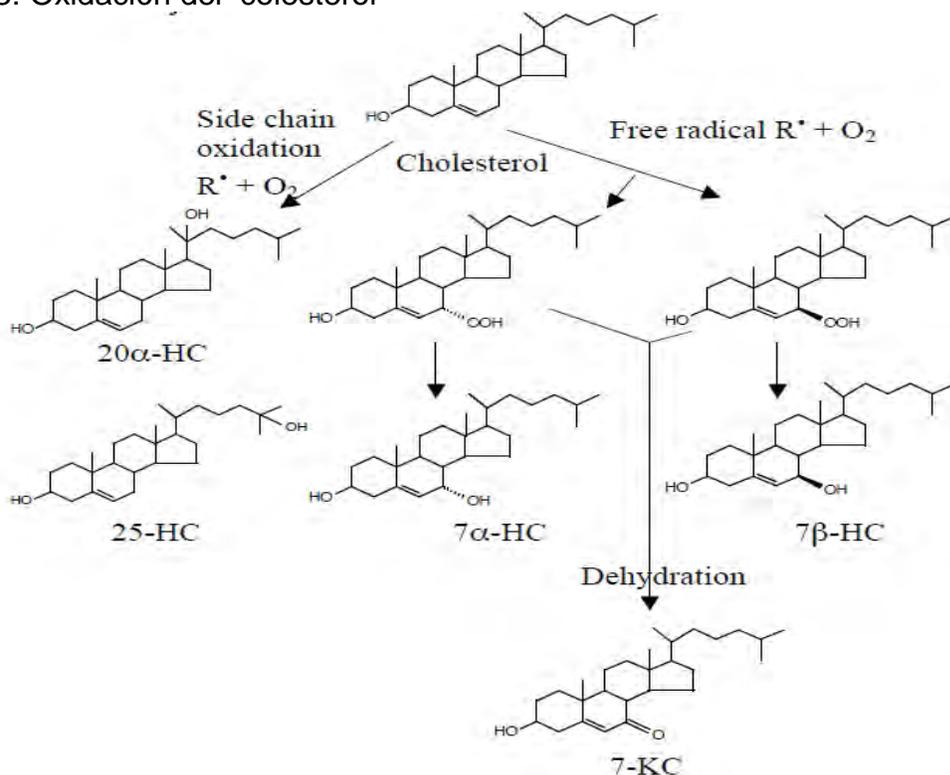
El conocimiento sobre los oxisteroles, su identificación, cuantificación, metabolismo y efectos biológicos es muy limitado. Su investigación presenta dificultades técnicas que en muchos casos afectan a los resultados de los estudios. La hipótesis de que los oxisteroles son potentes moduladores de la

<sup>19</sup> Lozada-Castro J.J. Determinación de óxidos de colesterol en muestras de alimentos mediante cromatografía de gases. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de ciencias químicas. Departamento de química analítica. Madrid, España. 2012

homeostasis del colesterol está apoyada por distintas observaciones, entre ellas la existencia de receptores nucleares que se unen a estos compuestos con alta afinidad y la potente regulación que los oxisteroles ejercen sobre la expresión de ciertos genes *in vitro*<sup>20</sup>.

Hasta el momento, se han documentado *in vitro* y en animales de experimentación algunos efectos biológicos de carácter aterogénico, citotóxico, angiotoxico e incluso mutagénico y carcinogénico. A pesar de saber que los oxisteroles exhiben una gran variedad de actividades biológicas, actualmente existe discrepancia entre los potentes efectos documentados en condiciones *in vitro* y los trabajos que demuestran su importancia fisiológica *in vivo*.<sup>21</sup>

Figura 3: Oxidación del colesterol<sup>22</sup>



Fuente: Zhang W.B., Addis P.B., Krick T.P., Quantification of  $5\alpha$ -cholestane- $3\beta,5\alpha,6\beta$ -triol and other cholesterol oxidation products in fast food French fried potatoes. 1991

<sup>20</sup> Morel, D., Yi Lin, C. Cellular biochemistry of oxysterol derived from the diet or oxidation *in vivo*. *NutBiochem* 1996; 7: 495-506.

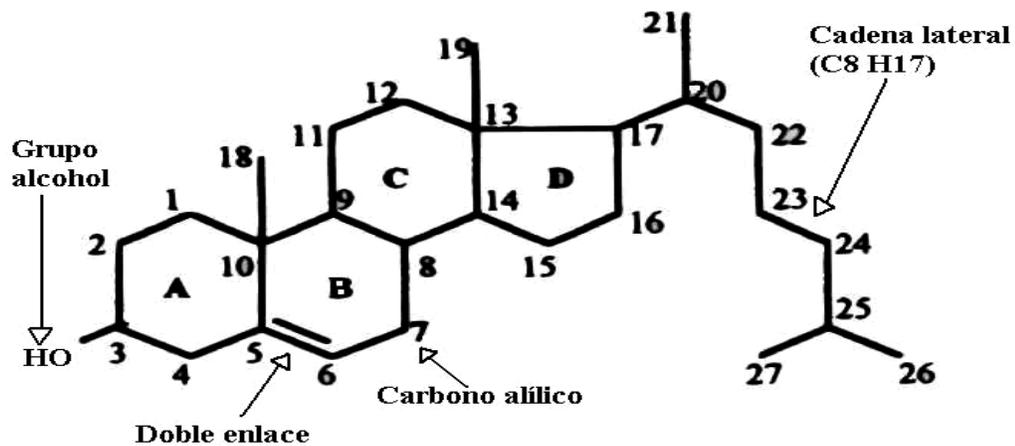
<sup>21</sup> *Ibid.* p 495.

<sup>22</sup> Zhang W.B., Addis P.B., Krick T.P., Quantification of  $5\alpha$ -cholestane- $3\beta,5\alpha,6\beta$ -triol and other cholesterol oxidation products in fast food French fried potatoes. *J. Food Sci.* 56, (1991), 716-718.

### 2.1.3 Rutas de Síntesis de Óxidos del Colesterol

Según se aprecia en la Figura 4, la molécula de colesterol está compuesta por 4 anillos (A, B, C y D) y una cadena lateral metilada. El anillo B es la parte más susceptible de sufrir reacciones de auto-oxidación debido a la presencia de un doble enlace en su estructura, lo que convierte al carbono 7 (C7) en la posición más propensa a sufrir reacciones oxidativas. La presencia de un grupo hidroxilo en la posición C3 le confiere al anillo A, una elevada estabilidad y una mayor resistencia a los procesos de auto-oxidación, por lo que los oxisteroles sintetizados por esta vía representan una fracción minoritaria respecto del perfil total de COPs formados. Por otra parte, dentro de la cadena alifática lateral, son los carbonos C20 y C25 los que debido a su conformación espacial, son más proclives a ser oxidados.<sup>23,24</sup>

Figura 4. Estructura del colesterol<sup>25</sup>



Fuente: Gil M. Bañon S. Laecetina J. Garrido M. *Oxidación del colesterol en carne y derivados*. 2004

En el caso concreto de la carne y derivados cárnicos, la cadena de reacciones mediada por radicales lipídico ha sido considerada como la principal vía de formación de oxisteroles<sup>26</sup>. La susceptibilidad de oxidación del colesterol ha sido

<sup>23</sup> Gil M. Op. Cit., p21

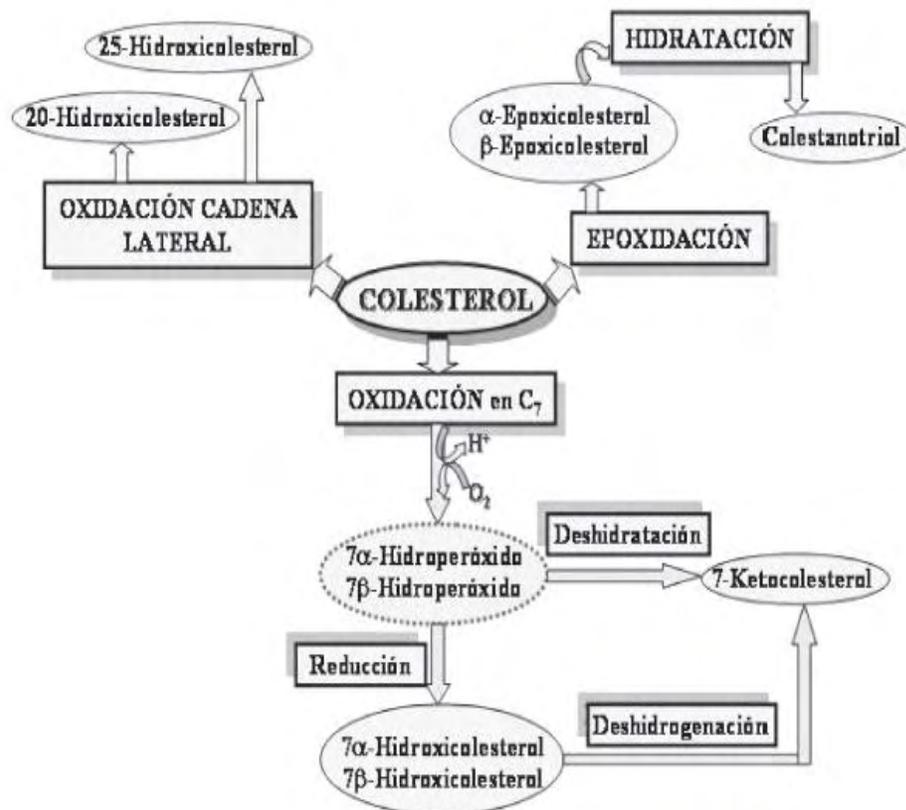
<sup>24</sup> Ansari, G.A., Walker, R.D., Smart, V.B., Smith, L.L. (1982). Further investigations of mutagenic cholesterol oxide preparations. *Food Chem Toxicol* 1982; 20: 35-41.

<sup>25</sup> Gil M. Bañon S. Op. Cit., p21

<sup>26</sup> Kritchevsky, D. Cholesterol vehicle in experimental atherosclerosis. *Arch Pathol Lab Med* 1988; 112: 1041-1044.

reconocido he investigado durante mas de varias décadas, sin embargo, las vías de formación de algunos COPs no han sido completamente aclaradas.<sup>27</sup> La oxidación de los lípidos y esteroides sigue los mismos patrones de oxidación de los lípidos tales como autooxidación, fotooxidación u oxidación enzimática, produciendo los hidroperóxidos correspondientes.<sup>28</sup>

Figura 5. Principales rutas de síntesis de COPs en carne y derivados<sup>29</sup>



Fuente: Gil M. Bañon S. Laacetina S. Garrido M. Oxidación de colesterol en carne y derivados. 2005

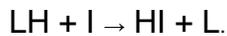
La autooxidación del colesterol se inicia tras la extracción de un hidrógeno en el C7 (Figura 4) mediante una reacción autocatalítica con oxígeno molecular formando los hidroperóxidos correspondientes a través de una serie de reacciones que

<sup>27</sup> Zhang W. Op. Cit., p 716

<sup>28</sup> Larkeson B, Dutta PC & Hansson I. Effects of frying and storage on cholesterol oxidation in minced meat products. J. Am. Oil Chem. 2000. Soc. 77, 675-680.

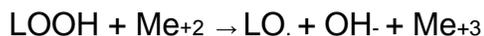
<sup>29</sup> Gil, M. Op. Cit., p21

implican radicales libres. Los lípidos insaturados (LH) pierden un radical (H.) de la posición  $\alpha$  con respecto al doble enlace generando radicales libres lipídicos (L.) por la presencia de iniciadores (I), que en este caso es el oxígeno triplete que es la forma más estable del oxígeno molecular generando los primeros radicales libres lipídicos.



Reacción 1

Los iniciadores se pueden generar por disociación térmica de hidroperóxidos preformados (LOOH) presentes como impurezas o por descomposición de los mismos catalizada por iones metálicos (Me) como hierro y cobre para generar radicales alcoxilo (LO.) o peroxilo (LOO.), según las siguientes reacciones:

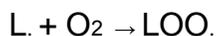


Reacción 2



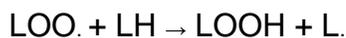
Reacción 3

Los radicales alquílicos de los lípidos generados, reaccionan rápidamente con el oxígeno molecular para generar radicales peroxilo de acuerdo a la siguiente ecuación:



Reacción 4

Posteriormente, el radical peroxilo reacciona con otra molécula de un lípido insaturado, generando un nuevo radical alquílico y un hidroperóxido que es el principal producto primario de la oxidación.<sup>30,31</sup>



Reacción 5

Los productos primarios de la oxidación del colesterol son altamente inestables, por lo que tienden a sufrir diversos tipos de reacciones que originan una amplia gama de oxisteroles. La reducción de ambos isómeros determina la síntesis de  $7\alpha$ - y  $7\beta$ -hidroxicolesterol, mientras que su deshidratación induce la aparición de la forma 7-cetocolesterol. En consecuencia, estos tres compuestos derivados del anillo B han sido identificados como los oxisteroles mayoritarios en distintos tipos de carne y productos cárnicos<sup>32</sup>.

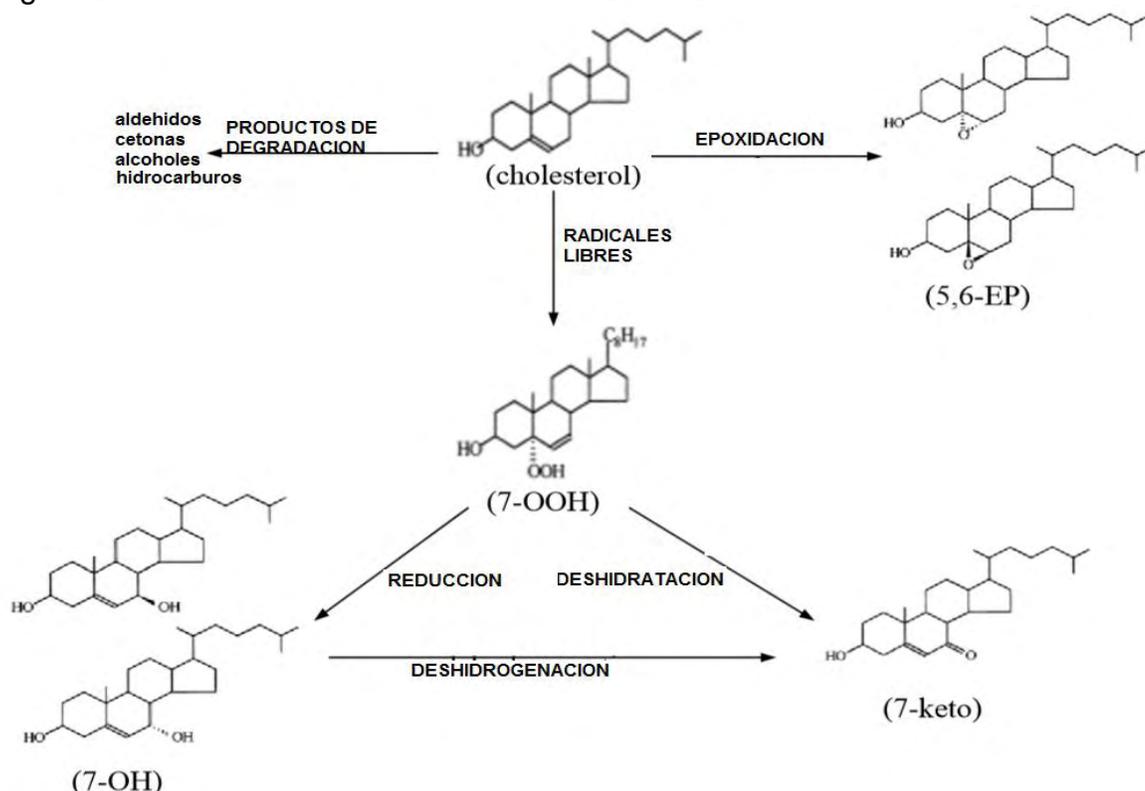
<sup>30</sup> Terrasa A. (2012) Alternativas tecnológicas aplicables al desarrollo y conservación de productos cárnicos cocidos (pates) durante el almacenamiento refrigerado. (tesis de matesria). Universidad de la plata. Facultad de ciencias veterinarias. Argentina., p 189

<sup>31</sup> Nielsen J. Olsen C. Skibsted L. (1996). Cholesterol oxidation in a heterogeneous system initiated by water-soluble radicals. Food chemistry . vol. 56. N° 1. P 33-37

<sup>32</sup> Pie J., Op. Cit., p 45

Cuando las reacciones de auto-oxidación se inician en la cadena lateral se originan 20, 24, 25 y 26-hidroperóxidos, la mayor parte de los cuales por descomposición térmica, dan lugar a sus respectivos alcoholes: 20, 25 y 26-hidroxicolesterol. En cualquier caso, la síntesis de este tipo de oxisteroles requiere de la aplicación de condiciones severas de calentamiento.<sup>33</sup>

Figura 6: Productos de la Autoxidación del Colesterol<sup>34</sup>



Fuente: Zhang W.B., Addis P.B., Krick T.P., Quantification of 5 $\alpha$ -cholestane-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol and other cholesterol oxidation products in fast food French fried potatoes. 1991.

Con respecto a la fotooxidación solo se da por la presencia de fotosensibilizadores como pigmentos naturales o sintéticos que en presencia de luz absorben energía en forma de radiación y la transfieren a partir del oxígeno singlete que es su forma

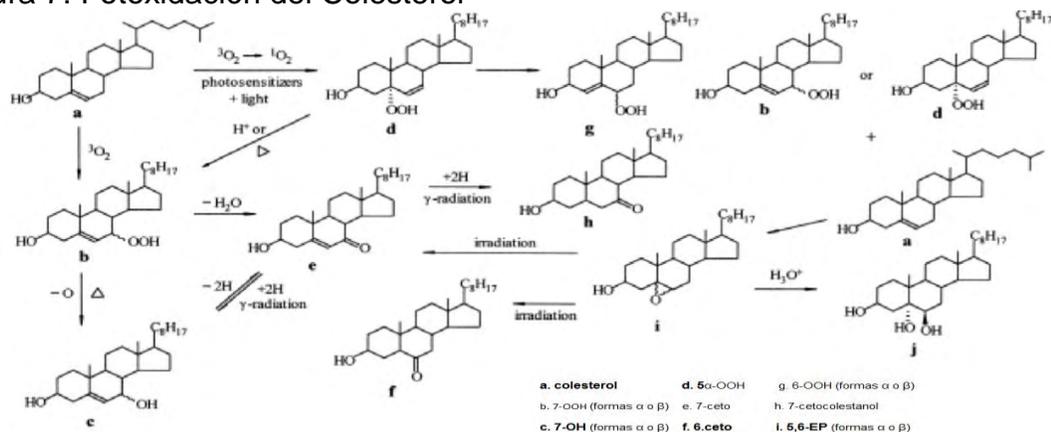
<sup>33</sup> Paniangvait P., King A.J., Jones A.D., German B.G., Cholesterol oxides in foods of animal origin. J. Food Sci. 606, (1995), 1159-1174

<sup>34</sup> Zhang W. Op. Cit. p 716

más activa,<sup>35,36,37</sup> Sin embargo, dependiendo de la intensidad de la luz la formación de los productos puede variar.

El oxígeno singlete reacciona con el anillo B del colesterol formando 5-Hidroperoxicolesterol el cual puede convertirse en 5 $\alpha$ -hidroxicoolesterol y la otra parte del hidropérido se convierte en otro más estable como el 7-hidroperoxicolesterol y 6-hidroperoxicolesterol los cuales se presentan en cantidades menores; sin embargo, con el aumento de la intensidad de la luz los 5,6-epoxicolesterol y 7-betahidroxicoolesterol pueden convertirse adicionalmente en 6-cetocolesterol y 7-cetocolesterol respectivamente; este resultado implica que tanto 7-Hidroxicoolesterol y 7-cetocolesterol pueden ser convertible en función de las condiciones de iluminación.<sup>38,39,40,41</sup>

Figura 7: Fotooxidación del Colesterol<sup>42</sup>



Fuente: Kumari, A. Cholesterol oxidation products-analytical methods and levels in sweets containing heated butter oil. 2005

<sup>35</sup> Ibid. p 717

<sup>36</sup> Kumari, A. Op. Cit., p 31

<sup>37</sup> Kulig, M. J. and Smith, L. Sterol metabolism. XXV. Cholesterol oxidation by singlet molecular oxygen. Journal of Organic Chemistry. 2003. 38: p 3639-3642.

<sup>38</sup> Maerker, G. and Jones, K. C. A-ring oxidation products from  $\gamma$ -irradiation of cholesterol in liposomes. Journal of American Oil Chemists Society. 1993. 70: 451-455.

<sup>39</sup> Hwang, K. T. and Maerker, G. 1993. Quantitation of cholesterol oxidation products in unirradiated and irradiated meats. Journal of American Oil Chemists Society. 70: 371-375.

<sup>40</sup> Nielsen, J. H., Olsen, C. E., Skibsted, L.H. 1996, Cholesterol oxides II. Measurement of the 5,6-epoxides during cholesterol oxidation in aqueous dispersion. Food Chemistry. 56:33-37.

<sup>41</sup> Ibid. p 45

<sup>42</sup> Ibid p 98

Con respecto a la oxidación enzimática, algunas investigaciones muestran que la conversión de los 5 $\alpha$ -hidroperóxicolesterol en 7 $\alpha$ -hidroperoxicoolesterol, la epimerización de 7 $\alpha$ -hidroperoxicoolesterol en 7 $\beta$ -hidroperoxicoolesterol y la formación de los epímeros del 7-Hidroxicoolesterol desde los correspondientes hidroperóxidos tiene lugar mediante reacciones enzimáticas, aunque estas reacciones deben ser estudiadas en mayor extensión debido al hecho de que estos productos se pueden formar también mediante las reacciones no enzimáticas. Las reacciones enzimáticas y no enzimáticas pueden ocurrir por separado o simultáneamente durante la producción, procesado, distribución y almacenamiento de los alimentos<sup>43</sup>.

#### 2.1.4 Efectos biológicos de los óxidos de colesterol.

La evidencia experimental ha permitido acumular información sobre los efectos biológicos de los oxisteroles. Si bien esta información ha sido obtenida a partir de modelos desarrollados in vitro, los resultados de muchos de ellos pueden ser extrapolados a situaciones in vivo. A manera de ejemplo, en diferentes modelos de estudio (células en cultivo, homogeneizados celulares, sistemas reconstituidos, entre otros), se ha observado que la adición de oxisteroles al sistema produce numerosos efectos, como la inhibición de la síntesis celular del colesterol, este efecto lo ejercen inhibiendo a la enzima hidroximetilglutaril CoA reductasa, punto clave en la regulación de la síntesis del colesterol. Se ha demostrado, además, que los oxisteroles inducen la apoptosis (muerte celular programada) en cultivos de tejidos.<sup>44,45</sup> También inhiben la síntesis del DNA, lo cual detiene el ciclo celular interfiriendo la división y proliferación de células en cultivo; Además, inhiben la actividad de la bomba de calcio. Otro efecto biológico de los oxisteroles es la inducción de la agregación de la trombina, lo cual podría explicar el efecto trombotico observado para estos productos de oxidación.<sup>46</sup> Además, en estudios in vitro se ha observado efectos mutagénicos y procarcinogénicos para algunos oxisteroles. Cabe destacar que la absorción y reabsorción intestinal de los oxisteroles en humanos es similar a la del colesterol<sup>47</sup>.

---

<sup>43</sup> Ibid., p 97

<sup>44</sup> Valenzuela A. Op. Cit., p 396

<sup>45</sup> Ibid., p 312

<sup>46</sup> Astiasarán, I; Ansorena, D; Echarte, M; Conchillo, A; Menéndez M. Óxidos de colesterol en alimentos cocinados con presencia habitual en nuestra dieta. Departamento de ciencias de la alimentación, fisiología y Toxicología. Facultad de farmacia. Universidad de navarra. Irunlarrea s.n., 31008 pamplona. (2007)

<sup>47</sup> Nishio, E., Watanabe, Y. (1996). Oxysterols induced apoptosis in cultured smooth muscle cells through CPP32 protease activation and bcl-2 protein down-regulation. *Biochim Biophys Res Commun* 1996; 226: 928-934.

De todos los efectos atribuidos a los oxisteroles quizás el que resulta más impactante o probablemente de mayor importancia es el rol que éstos pueden tener en la aterogénesis, es decir, los oxisteroles están presentes en la placa aterosclerótica y podrían tener un papel activo en su desarrollo más potente incluso que el de las LDL oxidadas endógenas. También podrían alterar la permeabilidad vascular, la síntesis de prostaglandinas y estimularían la agregación plaquetaria, facilitando por otro mecanismo la aterosclerosis y trombosis vascular<sup>48</sup>. Estas LDL oxidadas se acumulan en el endotelio de los vasos sanguíneos constituyendo uno de los componentes más importantes del ateroma. El proceso de oxidación de las LDL en la que participa el colesterol, también va acompañada por la formación de una variedad de oxisteroles, aunque se desconoce el efecto que puede tener la presencia de estos productos de oxidación en la función metabólica y en la probable acción patológica de esta lipoproteína.<sup>49,50,51</sup>

## 2.2 CONTENIDO DE COLESTEROL EN LOS INSUMOS DEL FRITO PASTUSO

### 2.2.1 *Colesterol en Carne de Cerdo*

Contrario a lo que pudiera pensarse, la carne de cerdo es el cárnico de mayor consumo en el mundo muy por encima del pollo y la res al representar el 46% del total, las principales razones de su preferencia radican en su fácil acceso y valor nutricional ya que aporta cierto contenido de grasas insaturadas con predominio de los ácidos grasos mono-insaturados que son los mas cardio saludables. Contiene, excelente calidad y cantidad de proteínas y es muy rica en potasio, el cual ayuda a mantener el equilibrio del agua y permite mantener una presión arterial normal (350 a 480 mg/100 g), Aporta hierro hémico, selenio - importante integrante del antioxidante glutatión peroxidasa y vitamina B1.<sup>52,53</sup> La carne de cerdo es muy apetecida a pesar de las supuestas repercusiones que su ingesta provoca en la salud.

La cantidad de grasa y colesterol son parámetros que permite clasificar la carne de cerdo como se ilustra a continuación:

---

<sup>48</sup> Nishio, E. Op. Cit., p 928

<sup>49</sup> Addis, P. Op. Cit. p 77

<sup>50</sup> Roux, C. Op. Cit p 127

<sup>51</sup> Ibid. p 315

<sup>52</sup> Astiasarán. Op. Cit. p 24

<sup>53</sup> Gabriela Carvajal S. Valor nutricional de la carne de Res, Cerdo y pollo. Corporación de fomento ganadero San José – costa rica. (2001)., p 120-324

Figura 8. Cortes de la carne de cerdo. Clasificación por su contenido graso.<sup>54</sup>



Fuente: Carvajal G. Valor nutricional de la carne de res, cerdo y pollo. 2007

- *Carne de primera:* (rojo) Lomo y filete, es una carne sin grasa visual, 0.6% grasa, sin nervios, cuero ni cartílagos.
- *Carne de segunda:* (amarillo) Pierna o pernil. Es carne con un contenido de grasa visual de 15%, sin cuero, nervios ni cartílagos.
- *Carne de tercera:* Costilla, espaldilla, cabeza de lomo, pecho. Es carne que presenta un contenido hasta 50 % de grasa, sin cuero, nervios ni cartílagos.

### 2.2.2 Frito Pastuso

Los orígenes del frito pastuso también llamado "Fritada" remontan a la época del colonialismo español, a principios de los años de 1800, El componente principal de este plato es la carne de cerdo frita, la cual representa un alimento muy importante dentro de la gastronomía nariñense, tanto por su contenido nutricional, como también por su precio en el mercado<sup>55</sup>.

La preparación de este plato empieza con la cocción de la carne en agua hirviendo con condimentos varios (ajo, sal, cebolla) y luego se fríe con grasa de cerdo en una paila de bronce sobre las llamas. Aunque también se puede obviar el paso de la cocción en agua, y freír la carne directamente en aceite bien caliente. El plato se acompaña en la mayoría de los casos de papas enteras hervidas, mote o choclo cocinado, cebollas, tomate en encurtido y plátano maduro frito.

---

<sup>54</sup> Ibid. p 125

<sup>55</sup> Ibid., p 132

### 2.3 ANÁLISIS BROMATOLÓGICO PARA DETERMINAR PARÁMETROS RELACIONADOS CON LA FORMACIÓN DE COPs.

El análisis bromatológico permite conocer la composición química de la carne de cerdo cruda y frito pastuso, de acuerdo a parámetros como lípidos extracto donde se encuentra el colesterol y los COPs, por otra parte, el contenido de humedad tanto en carne cruda como frita es de gran importancia, puesto que el contenido de agua influye en el proceso de formación de este tipo de oxiesteroles por la formación de radicales libres a partir del agua, como por ejemplo la formación del colestanoetriol; de igual manera, en la evaluación de cenizas se analizará el contenido de minerales los cuales influyen en gran medida en la oxidación de lípidos, ya que los iones metálicos pueden generar compuestos reactivos como los lipoperóxidos desencadenando así el proceso de formación de oxiesteroles, además factores como temperatura y otros influyen en mayor medida para su formación incrementando así su concentración.<sup>56</sup> En la tabla 2 se presenta el valor de estos parámetros en carne de cerdo como lomo, pierna y costilla.

Tabla 2: Valores promedio de algunos parámetros bromatológicos en carne de Cerdo cruda<sup>57</sup>.

P. Bromatológico	Lomo	Pierna	Costilla
Colesterol (g/100g)	38.42	43.36	48.21
Humedad (g/100g)	68	71.6	63.6
Calcio (mg/100g)	10	8.5	10.7
Hierro (mg/100g)	0.52	0.56	0.98
Fosforo (mg/100g)	216.45	216.7	179.9
Proteínas (g/100g)	27.2	22.5	18.5
Lípidos (g/100g)	3.7	4.8	16.9

Fuente: ICBF. Tabla de composición de alimentos colombianos, 2005.

Por otra parte, los contenidos de colesterol son importantes debido a que es un lípido presente sólo en los productos de origen animal el cual es sintetizado en los

<sup>56</sup> Pie J. OP. Cit., p 973

<sup>57</sup> Instituto colombiano de bienestar familiar. Tabla de composición de alimentos. 2005

procesos metabólicos y se encuentra presente en carne de cerdo,<sup>58,59</sup> siendo un parámetro importante en este estudio, ya que puede estar relacionado en la formación de COPs<sup>60,61,62,63</sup>.

## 2.4 TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA ANÁLISIS DE COPs

### 2.4.1 Generalidades Sobre Cromatografía

#### 2.4.1.1 Cromatografía de Adsorción

La adsorción es la propiedad que tienen ciertos sólidos de aumentar la concentración en su superficie de otras sustancias. La separación se debe a las diferencias de adsorción de los componentes de una mezcla sobre la fase estacionaria. La fase estacionaria ha de ser un sólido polar de gran superficie (adsorbente) y la fase móvil un líquido.

El grado de adsorción varía según la naturaleza y superficie específica de los adsorbentes y naturaleza de los solutos. Los enlaces entre moléculas adsorbidas y el adsorbente han de ser débiles para que su fijación sea reversible, las uniones son debidas a fuerzas intermoleculares (interacciones dipolo-dipolo o puentes de hidrógeno). Como regla general, las polaridades del adsorbente y de los solutos han de ser opuestas<sup>64</sup>.

---

<sup>58</sup> Shu-Mei Lsi, Ian Gray, and Matthew E. Zabik, Evaluation of Extraction and Gas Chromatography for Determination of Cholesterol Oxidation Products in Spray-Dried Whole Egg, *J. Agric. Food Chem.*, American Chemical Society 43 (1995) 1122-1126.

<sup>59</sup> Carreño, M. García, C. Astiarán, I. Ansorena, D. Validation of a Gas Chromatography-Mass Method for the Analysis Sterol Oxidation Products in Serum, *Journal of Chromatography B*, 864 (2008) 61-68.

<sup>60</sup> Pearson. D; *Técnicas de laboratorio para el análisis de Alimentos*; Acribia, S.A Zaragoza (España) 1993.

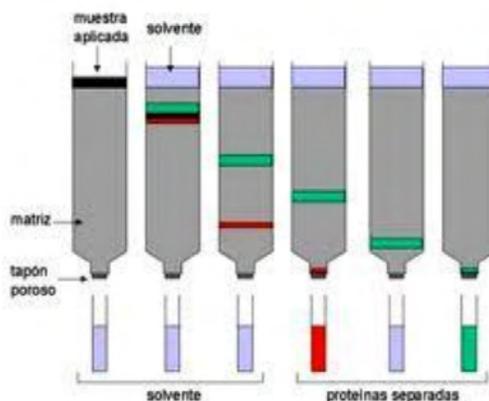
<sup>61</sup> Egan, H., Kirk, R., & Sawyer, R., "Análisis Químico de Alimentos de Pearson", 4ta edición, Compañía Editorial Continental, S.A. de C.V., México, 1991, p. 13-17, 19-39.

<sup>62</sup> Cecil B. Johnson, Isolation of cholesterol oxidation products from animal fat using aminopropyl solid-phase extraction, *Journal of Chromatography A*, 736 (1996) 205-210.

<sup>63</sup> Horwitz, W.. *Official methods of analysis of AOAC 985.29 international*, 18th edition, AOAC International, Maryland, USA (2005).

<sup>64</sup> Skoog, D. Holler, J. Nietman, T. *principios de análisis instrumental*. Madrid. Mc Graw-Hill, 1992.

Figura 9: Elución de una muestra por cromatografía (SPE)<sup>65</sup>



Fuente: Manual de cromatografía. 2001

#### 2.4.1.2. Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC)

Es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica, clasificándola como un tipo de cromatografía de adsorción.

En la HPLC isocrática, el compuesto pasa por la columna cromatográfica a través de la fase estacionaria mediante el bombeo de líquido (fase móvil) a alta presión a través de la columna. La muestra a analizar es introducida en pequeñas cantidades y sus componentes se retrasan diferencialmente dependiendo de las interacciones químicas o físicas con la fase estacionaria a medida que adelantan por la columna. El grado de retención de los componentes de la muestra depende de la naturaleza del compuesto, de la composición de la fase estacionaria y de la fase móvil. La presión en este tipo de cromatografías incrementa la velocidad lineal de los compuestos dentro de la columna y reduce así su difusión dentro de la columna mejorando la resolución de la cromatografía. Los disolventes más utilizados son el agua, el metanol y el acetonitrilo. El agua puede contener tampones, sales, o compuestos como el ácido trifluoroacético, que ayudan a la separación de los compuestos<sup>66</sup>.

Para mejorar el tiempo de los análisis y la forma de los cromatogramas se ha introducido a la técnica de HPLC descrita como variable la composición de la fase móvil durante el análisis, conocida como elución en gradiente. Un gradiente

<sup>65</sup> Manual de cromatografía. [citado en noviembre 16 de 2012] disponible en internet: [http://ocw.uv.es/ocw-formacio-permanent/2011-1-35\\_Manual.pdf](http://ocw.uv.es/ocw-formacio-permanent/2011-1-35_Manual.pdf)

<sup>66</sup> Skoog, Op Cit., p 786

normal en una cromatografía de fase reversa puede empezar a un 5% de acetonitrilo y progresar de forma lineal hasta un 50% en 25 minutos<sup>67</sup>.

## 2.5 CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC) APLICADA PARA EL ANÁLISIS DE COPs

Los productos de oxidación del colesterol están presentes en pequeñas cantidades en los alimentos; Por lo tanto, su detección y cuantificación son desafiantes ya que tienen diferentes características químicas, tales como su polaridad debido a los diferentes grupos funcionales en su estructura química. Por otro lado, los isómeros de algunos COPs pueden mostrar un comportamiento químico similar, como espectros y características de fragmentación. Estas razones hacen que se elija cuidadosamente un método sensible y un sistema para identificar y cuantificar los COPs. La elección de la herramienta analítica se rige por el tipo de matriz y el alcance del análisis.<sup>68</sup>

Es por ello que la Técnica de HPLC es el mejor método para analizar COPs, debido a la posibilidad de separación, detección y cuantificación, especialmente de las moléculas termo-lábiles ya que es una técnica no destructiva. La cromatografía por HPLC es un sistema analítico muy versátil debido a su capacidad de actuar con muchos sistemas de detectores, revertir los modos de fase utilizando diferentes tipos y dimensiones de las columnas y la composición de la fase móvil dando lugar a su identificación y cuantificación.<sup>69,70,71</sup>

---

<sup>67</sup> Manual de cromatografía. Op. Cit., p 24

<sup>68</sup> Rodrigues estrada y caboni 2002

<sup>69</sup> Zhang, T. Op. Cit., p 20

<sup>70</sup> Kumari, A. Op. Cit. p 124

<sup>71</sup> Manual de cromatografía. Op. Cit., p 23

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 Descripción de Reactivo

##### 3.1.1 Estándares

- ✓ 25-hidroxicolesterol, (25-OH)Sigma-Aldrich USA, 98 %
- ✓ 6-cetocolesterol (6-Ceto), Sigma-Aldrich USA, 98 %
- ✓ 7-cetocolesterol (7-Ceto), superior al 90% de Sigma-Aldrich USA.
- ✓ Colesterol, Merck – Alemania, 98%

##### 3.1.2 Disolventes

- ✓ Acetonitrilo (ACN) ACS/HPLC, Marca: Burdick Jackson
- ✓ Cloroformo (CHCl<sub>3</sub>) ACS/HPLC, Marca: Burdick Jackson
- ✓ 2-Propanol ( 2-PrOH), ACS/HPLC Marca: Burdick Jackson
- ✓ n-Hexano, AR-ACS, Marca: Burdick Jackson
- ✓ acetona ACS/HPLC, Marca: Burdick Jackson
- ✓ ÉterEtilico AR-ACS de Burdick Jackson
- ✓ Sulfato de sodio, Panreac PA-ACS-ISO (España),

##### 3.1.3 Preparación de disoluciones

A partir de los estándares de COPs y colesterol se prepararon las diferentes diluciones empleadas en el montaje del método. Estas diluciones se realizaron para el caso de los COPS en Acetonitrilo grado HPLC y para el caso del Colesterol en IPA (2-propanol), teniendo en cuenta las especificaciones del fabricante. La elección del solvente orgánico apropiado para la extracción se hizo en base a las consideraciones recomendadas por Lozada et al.,<sup>72</sup> y Daneshfar et al.,<sup>73</sup> teniendo en cuenta la buena afinidad por los compuestos objetivo, baja solubilidad del solvente en agua y excelente comportamiento mediante HPLC.

#### 3.2 Materiales y Equipos

##### 3.2.1 Materiales

- ✓ Cartuchos de sílica para SPE de 500mg/ 3mL Discovery Supelco (USA).
- ✓ Filtros de nylon de 4 mm y 0.45 µm National Scientific (USA).
- ✓ Mortero de porcelana.

---

<sup>72</sup> Lozada, J. Op. Cit.

<sup>73</sup> Daneshfar, A. Khezeli, T. Lotfi, H. Determination of colesterol in food sample using dispersive liquid-liquid microextraction followed by HPLC. Journal of Chromatography B. 877., p 456-460. 2009

- ✓ Viales de 12 y 4 mL National Scientific (USA).

### 3.2.2 Equipos Cromatográficos

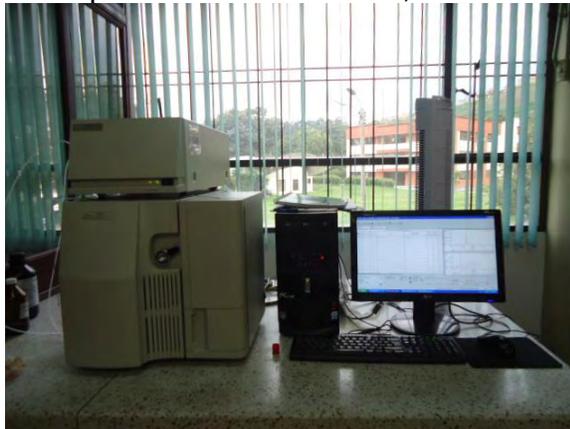
#### 3.2.2.1 Cromatógrafo de Líquidos de Alta Eficiencia

Tabla 3: Especificaciones del equipo cromatográfico HPLC para análisis de colesterol y COPs.

Cromatógrafo	Descripción
Técnica	HPLC en fase reversa
Equipo	WATERS BREEZE
Detector	PDA 2998 (190-400nm)
Columna	C <sub>8</sub> (150 x 4,6mm) 3,0um Thermo Scientific
Inyector	Rheodyne 75251 LOOP de 20 µL

Fuente: Esta investigación

Figura 10: Cromatógrafo líquido de alta eficiencia, HPLC



Fuente: Esta Investigación

### 3.3 Desarrollo del Método

#### 3.3.1 *Preparación de las disoluciones estándar de trabajo*

##### 3.3.1.1 Solución estándar de colesterol

Se pesó en una balanza analítica 0.0165 g de colesterol en un matraz aforado de 25 mL, se enrasó con Isopropanol, siendo la concentración final de esta disolución 323.5 ppm. Se conservó en congelador a -20° C.

##### 3.3.1.2 Solución estándar de 7-Cetocolesterol

Se pesó en una balanza analítica 0.0116 g de 7-ceto en un matraz aforado de 10 mL clase A, se enrasó con Isopropanol, siendo la concentración final de esta disolución 1160 ppm. Se conservaron a -20°C.

##### 3.3.1.3 Solución estándar de 6-Cetocolesterol

Se pesó en una balanza analítica 0.0010 g de 6-ceto en un matraz aforado de 10 mL Clase A, se enrasó con Isopropanol, la concentración final de esta disolución fue 980 ppm. Se conservó en congelador a -20° C.

##### 3.3.1.4 Solución estándar de 25-Hidroxicolesterol

Se pesó en una balanza analítica 0.0011 g de 25-OH en un matraz aforado de 10 mL clase A, se enrasó con Isopropanol; la concentración final de esta disolución fue 107.8 ppm. Se conservó en congelador a -20° C.

#### 3.3.2 *Calibrados*

##### 3.3.2.1 Soluciones de COPs para el Calibrado de HPLC

Para este punto se preparó la mezcla de estándares a concentraciones de 0,1; 0,5; 1,0; 10,0; 20,0; y 100,0 ppm de 25-OH, 7-ceto y 6-ceto a partir de sus disoluciones estándar y se enrasaron con ACN.

Con respecto al colesterol se prepararon soluciones de 10,0; 30,0; 50,0; 100,0; 150,0; y 200,0 ppm a partir de la disolución estándar y se enrasaron con 2-propanol, realizando inyecciones por triplicado en todos los casos.

Tabla 4: Volúmenes de la mezcla de patrones

Concentración (ppm)	Vol <sub>T</sub> solución	Sln 25-OH	Sln 7-ceto	Sln 6-ceto
0,1	5 mL	25 µL	25 µL	5 µL
0,5	5 mL	125 µL	125 µL	25 µL
1,0	5 mL	250 µL	250 µL	50 µL
10	5 mL	2500 µL	2500 µL	500 µL
20	5 mL	5000 µL	5000 µL	1000 µL
100	5 mL	25000 µL	25000 µL	5000 µL

Fuente: Esta investigación

### 3.4 Montaje de la técnica por HPLC.

Las condiciones cromatográficas se determinaron mediante la inyección de la mezcla de estándares a condiciones reportadas por Lozada-Castro et al.,<sup>74</sup> usando columna C8 y flujo 1,5 mL/min, hasta obtener una adecuada resolución y simetría de los picos.

#### 3.4.1 Revisión del método cromatográfico.

Los resultados de los ensayos de adecuación se analizan estadísticamente para revisar el método cromatográfico y garantizar el aceptable desempeño de los criterios de ensayo para su propósito. Estos parámetros analizados que nos permiten asegurar el funcionamiento del método son:

- ✓ Linealidad y sensibilidad
- ✓ Precisión
- ✓ Exactitud

##### 3.4.1.1 Linealidad

A partir de una solución de mezcla de patrones de COPs de 20 ppm y colesterol 50 ppm respectivamente, se preparó una serie de diluciones que comprendieron los ámbitos estimados de trabajo con un exceso de al menos el 50% del límite superior y un defecto de 50% debajo del límite inferior, la curva de calibración se realizó con los siguientes puntos 0,1: 0,5: 1: 5, 10 y 20 ppm para el caso de los COPs y 10,30,50,100 y 200ppm para colesterol. Las soluciones se inyectan por triplicado al equipo de HPLC. Con las áreas obtenidas se determina la curva de regresión de cada compuesto la cual presento la forma  $Y= mx+b$ , los valores de la

<sup>74</sup> Lozada-Castro J. Gil-Díaz M. Santos-Delgado M. Rubio-Barroso S. Polo-Díez L. (2011). Effect of electron-beam irradiation on cholesterol oxide formation in different ready-to-eat-foods. Innovative food science and emerging technologies. V. 12., p 519-525

pendiente, intercepto, coeficiente de correlación así como el rango dinámico lineal fueron encontradas a través del tratamiento de los datos aplicando el método de los mínimos cuadrados. Posteriormente se graficó para su documentación.<sup>75</sup>

#### 3.4.1.2 Selectividad

La selectividad se define como “la extensión en la que un método puede utilizarse para determinar analitos particulares en mezclas o matrices sin interferencias de otros componentes con un comportamiento similar”. Para su determinación se preparó una solución de mezcla de patrones de COPs de 100ppm, la cual se inyectó por triplicado en el equipo de HPLC: Los resultados obtenidos como tiempos de retención, áreas y anchos de picos, de los analitos en estudio, fueron empleados para expresar la selectividad en términos de Factor de Capacidad, Factor de Selectividad y la Resolución<sup>76</sup>.

#### 3.4.1.3. Precisión

En este caso la precisión de la señal se midió en condiciones repetitivas (mismo analista, mismo día y mismo instrumento) y en condiciones reproducibles (diferente analista, diferente día, igual instrumento)<sup>77</sup>.

##### 3.4.1.3.1 *Repetibilidad*

Para la determinación de la repetibilidad se preparó una solución patrón de cada uno de los analitos de interés, en el caso de los COPs las soluciones preparadas fueron de 20 ppm y en el caso del colesterol la solución fue de 100 ppm. Cada una de ellas se inyectó al menos 5 veces al equipo de HPLC por mismo analista, mismo día, mismo instrumento. La determinación de la repetibilidad se expresa en términos de la concentración media, la desviación estándar y el coeficiente de variación tanto de áreas (cuantitativa) como de los tiempos de retención (cualitativa).<sup>78</sup>

---

<sup>75</sup> Quattrocchi, O. Andrizzi, S. Laba, R. Introducción a la HPLC, aplicación y práctica, análisis cualitativo. Editorial farro. S.A. Buenos Aires. 1992., P 132

<sup>76</sup> Ibid., p 46-48, 309

<sup>77</sup> Ibid., p 317

<sup>78</sup> Ibid., p 318

#### 3.4.1.3.2 Reproducibilidad

El procedimiento es similar al apartado anterior solo que a inyección se realiza con diferente analista y diferente día (5 días). Los resultados de áreas y tiempos de retención nos permitieron evaluar este parámetro en términos de concentración media, desviación estándar y coeficiente de variación.

#### 3.4.1.4. Límites de Confianza

Se determinó los intervalos de confianza para los tiempos de retención de cada pico de los analitos en estudio, para ello se preparó una mezcla de estándares de 20ppm para el caso de los COPs y de 100ppm para colesterol. Estas soluciones se inyectaron al equipo 10 veces, se determina el valor promedio de los tiempos de retención, y la desviación estándar. El límite de confianza se determinó a partir de la ecuación 1:<sup>79</sup>

$$\bar{X} - \frac{t_{v,\alpha} \cdot S}{\sqrt{n}} < \mu < \bar{X} + \frac{t_{v,\alpha} \cdot S}{\sqrt{n}} \quad \text{Ecuación 1}$$

Dónde:  $t_{v,\alpha}$  es el valor "t de Student", tabulado para n mediciones. Con  $v = n-1$  grados de libertad y para varios niveles de  $\alpha$  de significación (el nivel más empleado es de  $p: 0,05$  correspondiente a un intervalo de confianza del 95%).

#### 3.4.1.5 Exactitud

También llamada error sistemático o de tendencia, corresponde a la diferencia entre el valor obtenido (media) y el valor verdadero. Para ello se tomó dos muestras de carne costilla, a partir de ella se realizaron las respectivas extracciones de los COPs según se describe más adelante. La primera solución es enriquecida con 50  $\mu\text{L}$  de una solución patrón de 100 ppm de COPs (solución enriquecida), la segunda solución fue sin enriquecer. Las muestras son inyectadas por separado y cada una por triplicado. La exactitud del método se expresó en términos de porcentaje de recuperación.<sup>80</sup>

#### 3.4.1.6 Sensibilidad

La sensibilidad se expresa en términos de límite de detección y cuantificación para ello se empleó el método de la señal ruido.<sup>81</sup> Este parámetro se calcula teniendo en cuenta las concentraciones más bajas de la mezcla de patrones de

---

<sup>79</sup> Ibid., p 316

<sup>80</sup> Ibid., p 319

<sup>81</sup> Skoog, Op Cit., p 14

COPs, como señal del blanco se utilizó el ruido de fondo de los cromatogramas determinando la magnitud promedio de la señal. La relación empleada en la determinación es:

$$S_m = S_{bl} + K \cdot S_b \quad \text{Ecuación 2}$$

Dónde:

$S_{bl}$ : Magnitud promedio de la señal del blanco,

$S_b$ : Desviación estándar de la señal del blanco,

$K = 3$  Constante con un 89% de confianza.

El límite de detección está determinado por la siguiente ecuación.

$$LD = (S_m - S_b) / m \quad \text{Ecuación 3}$$

Dónde:

$S_b$ : Desviación estándar de la señal del blanco,

$m$ : Pendiente de la curva de calibración.

El límite de cuantificación se determinó a partir de:

$$S_{mc} = S_{bl} + K \cdot S_b \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde,  $K = 10$

Ahora bien el LQ será:

$$LQ = (S_{mc} - S_b) / m \quad \text{Ecuación 5}$$

Este procedimiento se determina tanto para COPs como para Colesterol. En la siguiente tabla se resume los parámetros estudiados para la revisión del método propuesto en la determinación de COPs por HPLC.

Tabla 5: Parámetros cromatográficos<sup>82</sup>

Método	Parámetro
Linealidad	Ecuación de regresión lineal coeficiente de regresión lineal Rango dinámico lineal
Selectividad	Factor de capacidad Factor de selectividad Resolución
Precisión	Repetitividad Reproducibilidad
Limites de confianza	al 95%
Exactitud	Porcentaje de recuperación

Fuente: Quattrocchi, O. Andrizzi, S. Laba, R. Introducción al HPLC. Aplicación y Práctica.

### 3.5 DISEÑO EXPERIMENTAL PARA ANÁLISIS DE COPs

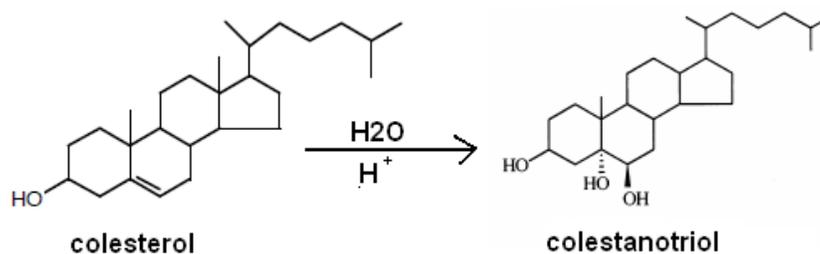
El diseño experimental aplicado para este trabajo fue completamente aleatorizado, estudiando el efecto de tres factores con tres niveles cada uno, sobre una variable de medida, que en este caso fue la concentración de COPs en el proceso de preparación de frito pastuso (tabla 6). En este trabajo se consideraron tres factores los cuales según la literatura influyen en gran medida en la oxidación del colesterol (figuras 6 y 7); como son la exposición del alimento a diferentes formas de preparación, el tipo de grasa o aceite y el tipo de pieza de carne de cerdo utilizado, debido a que los contenidos de colesterol son diferentes en ambos casos, siendo el último factor el componente principal del frito pastuso.

- ✓ Tipo o forma de preparación del frito pastuso según su forma tradicional: cocción en agua y después fritura y tiempo de condimentación. En este punto es importante resaltar que además de evaluar la preparación tradicional del plato típico, se evaluarán alternativas que conducen a obtener el mismo plato pero de forma diferente como es la fritura de la carne directamente, aunque no sea una forma tradicional de preparación pero que si es utilizada.

<sup>82</sup> Quattrocchi. Op. Cit., p 133

- ✓ Tipo de aceite utilizado: Debido a que la cantidad de grasa de la carne de cerdo es variable en cada parte del animal, se tuvo en cuenta para el estudio tres tipos de carne como son, costilla, lomo y pierna, los cuales varían en contenidos de colesterol, lípidos y metales. Por tal razón, es de gran importancia en el estudio el conocimiento de estas concentraciones, ya que es bien conocido que el colesterol es propio de los animales, sin embargo, aunque se utilizó aceite de tipo vegetal que tienen bajo contenido de colesterol, los procesos de reutilización de estos aceites conllevan a la formación de sustancias indeseadas como óxidos, nitritos, radicales libres (lipoperóxidos), los cuales desencadenan la formación de COPS.
- ✓ Humedad: La cantidad de agua es de gran importancia ya que muchos de los compuestos de interés se forman por interacción con el agua como por ejemplo el colestanoetriol (figura 11).

Figura 11: Efecto del agua en la formación de COPS<sup>83</sup>



*Fuente:* Kumari, A. Cholesterol oxidation products-analytical methods and levels in sweets containing heated butter oil.2005

Aunque el contenido de colesterol es un parámetro de gran importancia, en este trabajo se consideró como variable de medida (carne cruda, frita y tipo de aceite usado), por tanto no se incluyó como factor en el diseño experimental, pero si se tuvo en cuenta en el análisis estadístico de correlación de factores.

<sup>83</sup> Kumari, A. Op. Cit., p 131

Tabla 6: Factores y niveles para análisis de COPs

FACTOR	NIVEL	CARACTERÍSTICAS
TIPO DE PREPARACION	P <sub>1</sub>	Carne adobada un día antes, cocción por 20 min, después frita por 10 min.
	P <sub>2</sub>	Carne adobada posterior a la preparación, cocción por 20 min, después se frita por 10 min.
	P <sub>3</sub>	Carne adobada posterior a la preparación y frita directamente por 30 min.
TIPO DE ACEITE	Vn	Aceite de palma
	Vr	5 veces reutilizado
	Gs	Grasa de cerdo sin utilizar
HUMEDAD	Ha	Lomo
	Hm	Pierna
	Hb	Costilla

P1: preparación 1, P2: preparación 2, P3: preparación 3

Vn: vegetal nuevo, Vr: vegetal reutilizado, Gs: manteca de cerdo

Ha: humedad alta, Hm: humedad media, Hb: humedad baja

Fuente: Esta investigación

### 3.5.1 Condimentos Utilizados

Se utilizará la tradicional condimentación para carnes en los puntos de muestreo, entre estos ingredientes se encuentran:

- Cebolla Larga
- Ajo
- Sal
- Comino.

Tabla 7: Cantidad de aliño utilizado en la preparación de frito pastuso para 1kg de carne.

CONDIMENTO	PARA 1Kg
Comino	3 g
Ajo	1 Diente
Sal	6 g
Cebolla larga	5 g
Agua	15 mL

Fuente: Esta investigación

### 3.5.2 HIPÓTESIS

La formación de COPs en frito pastuso está directamente relacionada con el tipo de preparación utilizado.

Tabla 8: Diseño experimental con dos experimentos centrales

Bloque	I										II									
Preparación	-1	-1	-1	0	1	-1	1	1	0	1	-1	-1	-1	0	1	-1	1	1	0	1
Aceite	1	-1	1	0	-1	-1	1	-1	0	1	1	-1	1	0	-1	-1	1	-1	0	1
Humedad	1	-1	-1	0	-1	1	1	1	0	-1	1	-1	-1	0	-1	1	1	1	0	-1

Fuente: Esta investigación

En la tabla anterior se identifica el tipo de preparación, el aceite y la humedad de la carne que se utilizaron en cada experimento, teniendo un total de 10 experimentos completamente aleatorizados. A continuación se presenta la clasificación de los niveles correspondientes a cada experimento de la tabla 8.

Tabla 9: Clasificación de cada nivel del diseño experimental

Nivel	Preparación	Aceite	Humedad
1	P <sub>1</sub>	Gs	Ha
0	P <sub>2</sub>	Vr	Hm
-1	P <sub>3</sub>	Vn	Hb

Fuente: Esta investigación

### 3.5.3 Muestras

Las muestras se adquirieron Porkilandia, punto de compra reconocido por los habitantes de la ciudad en donde comúnmente se adquiere la carne de cerdo.

El análisis de fritura, se llevó a cabo con dos tipos de grasa: vegetal (Aceite de palma) y animal (Manteca de cerdo), Los cuales se obtuvieron en Alkosto, almacén de cadena reconocido por los ciudadanos.

Las muestras de carne de cerdo cruda y frita, se empacaron al vacío inmediatamente en bolsas de poliestireno; cada bolsa contenía 20 g de muestra y se refrigeraron a -22°C, esto con el propósito de retardar la proliferación de microorganismos, así como para disminuir la velocidad con la que transcurren reacciones químicas y enzimáticas deteriorativas de la carne<sup>84</sup>.

<sup>84</sup> Pearson, D. Op. Cit., p 231

### 3.6 Determinación de parámetros característicos de la muestra

Se tuvo en cuenta solo los parámetros que afectan posiblemente a la formación de COPs, como la humedad, el contenido de minerales importantes en la carne (hierro) y grasa total, realizados en los laboratorios especializados de la Universidad de Nariño. El colesterol se determinó por HPLC. La tabla 10 resume las características y los métodos para su identificación.

Tabla 10: Análisis Bromatológico<sup>85</sup>

Parámetro	Método	Técnica
Humedad	Secado en Estufa AOAC	Gravimétrica
Hierro	Oxidación húmeda, EAA	Espectrofotométrica
Grasa Total	Extracción SOXHLET	Gravimétrica
Colesterol	HPLC	Separación Cromatográfica

Fuente: *Pearson, D. Técnicas de laboratorio para el análisis de alimentos. 1993*

### 3.7 Preparación de las muestras para la determinación de COPs por HPLC

#### 3.7.1 Lixiviación

Cada muestra a temperatura ambiente, se troceó y se trituró por medio de un mortero de porcelana. Se pesó 6,0 g de muestra y se introdujo en un erlenmeyer esmerilado con tapa de 100 mL, se añadió 70 mL de  $\text{CHCl}_3$  y se sometió a agitación magnética a 780 rpm durante 18 horas, protegido de la luz para evitar reacciones oxidativas durante el proceso (figura 14). Seguidamente, se filtró a gravedad, recogiendo el filtrado en un recipiente ámbar (figura 15); el extracto de cloroformo se hizo pasar por un cartucho conteniendo 10 g de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro y seguidamente, se lavó el residuo dos veces con porciones de 10 mL de  $\text{CHCl}_3$  y se recogieron todas las fracciones de  $\text{CHCl}_3$  en un balón de fondo redondo de 100 mL, el cual se rotavaporó a 40 °C eliminando completamente el  $\text{CHCl}_3$ .

<sup>85</sup> Ibid., p 235

Figura 12: Proceso de lixiviación



Fuente: Esta investigación

Figura 13: Filtración del extracto de cloroformo



Fuente: Esta investigación

### 3.7.2 Extracción en Fase Sólida (SPE)

El extracto se disolvió en 6,0 mL de Hexano y se llevó a cabo la limpieza de la muestra mediante SPE, pasándolo a través de un cartucho de sílica de 500 mg (figura 16) previamente acondicionado con 5,0 mL de Hexano. Los analitos retenidos en el cartucho se lavaron con 10, 25 y 15 mL de una mezcla de Hex: Et<sub>2</sub>O en proporción (95:5. v/v), (90:10. v/v) y (80:20. v/v) respectivamente; este

extracto se recogió en un balón de 100 mL y se rotavaporó a 40 °C obteniendo un residuo. Los COPs fueron eluidos del cartucho adicionando 10 mL de acetona la cual se rotavaporó a 38 °C; el exceso de solvente fue eliminado con flujo de nitrógeno a temperatura ambiente.

Figura 14: Cartuchos de sílica gel utilizados para extracción en fase sólida.



Fuente: Esta investigación

### 3.7.3 Determinación de colesterol mediante HPLC en muestras de alimentos.

El residuo obtenido en la sección 3.7.2 se diluyó en 8 mL de isopropanol, se inyectaron 20  $\mu$ L en el sistema cromatográfico a través de un filtró con membrana de nylon de 0.4  $\mu$ m y 4 mm y se midió a una longitud de onda de 205 nm.

Figura 15: Extracto final de COPs sin ACN



Fuente: Esta investigación

### 3.7.4 Determinación de COPs mediante HPLC en muestras de carne

El residuo obtenido en la sección 3.7.2 se disolvió con 250  $\mu\text{L}$  de ACN, se inyectaron 20  $\mu\text{L}$  en el sistema cromatográfico a través de un filtró con membrana de nylon y se midieron a 205 y 238 nm respectivamente.

Figura 16: Extractos de colesterol y COPs disueltos en IPA y ACN respectivamente



Fuente: Esta investigación

### 3.7.5 Preparación de Muestras de Aceite Vegetal

Se midió 1ml de aceite vegetal y se disolvió en 6 ml de Hexano. La limpieza se realizó de igual manera que la descrita en la sección 3.7.2

### 3.7.6 Preparación de Muestras de Grasa Animal

Se pesó 1g de grasa y se disolvieron en 6 ml de hexano agitando constantemente, se pasa por un cartucho de sílica gel de 500 mg de fase estacionaria, continuando con el procedimiento descrito anteriormente para la muestra de carne y aceite

## 3.8 Preparación de Muestras Para Análisis de COPs por GC/MS

### 3.2.1 Derivatización con Tri-Sil

En un vial ámbar de 12 mL se agregó 40  $\mu\text{L}$  del extracto obtenido en la fase de limpieza (apartado 3.7.2). Sobre el residuo fueron añadidos 400  $\mu\text{L}$  de Tri-Sil y la mezcla se agitó vigorosamente durante 2 min en vortex. Seguidamente, la reacción fue llevada a cabo a 60  $^{\circ}\text{C}$  durante 45 min dentro del sistema de calentamiento Tembloc; después de alcanzar la temperatura ambiente, el exceso de Tri-Sil fue eliminado mediante flujo de Nitrógeno. A continuación, se añadieron al residuo 400  $\mu\text{L}$  de Hexano agitando vigorosamente durante 2 min en vortex. El

extracto fue filtrado a través de un filtro de nylon de 4 mm y 0.45µm de tamaño de poro e inyectado en el sistema cromatográfico GC/MS. El procedimiento se hizo de igual manera para una alícuota de 50 ppm de la mezcla estándar disuelta en 2-PrOH a la cual se le evaporó el disolvente con flujo de Nitrógeno. El tratamiento seguido fue similar al descrito en este apartado.<sup>86</sup>

### 3.3 Análisis por Cromatografía de gases-espectrómetro de masas

Se usó un Cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masas Shimadzu QP 2010S, columna capilar SHAXI 5 – MS (30 m, 0,25mm x df 0,25 µm), en modo isoterma a 290 °C, con He como gas portador a un flujo de 1.6 mL/min. T<sub>detector</sub> y T<sub>inyector</sub> de 300 °C; se inyectaron 2 µL del extracto de los Tri-Sil derivados en el inyector split-splitless a una relación de split de 3:1. Los espectros se obtuvieron en modo scan, identificando las estructuras moleculares por comparación con espectros de masa que figuran en la librería NIST 05.

### 3.4 Análisis Estadístico

#### 3.4.1 *Anova del Diseño Experimental*

El análisis de resultados, se realizó mediante un análisis de varianza o ANOVA, el cual implica medidas de dispersión (media, mediana, desviación estándar, límites de confianza etc.)

#### 3.4.2 *Análisis de Correlaciones COPs - Parámetros Bromatológico*

Para determinar la relación que existe entre los factores que influyen en la formación de COPs y su cantidad en la carne de cerdo se utilizó el programa Statgraphics Centurión XVI, para llevar a cabo un test mediante ANOVA, varianza, gráficos de correlación, indicando si estos parámetros están asociados a la formación de COPs en el frito pastuso.

---

<sup>86</sup> Lozada, J.J. Op.Cit., p 132

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 ETAPAS DEL MÉTODO

#### 4.1.1 Condiciones Cromatográficas

La tabla 11 indica las condiciones cromatográficas de análisis que se optimizaron para análisis de 25-Hidroxicolesterol, 6-Cetocolesterol y 7-Cetocolesterol.

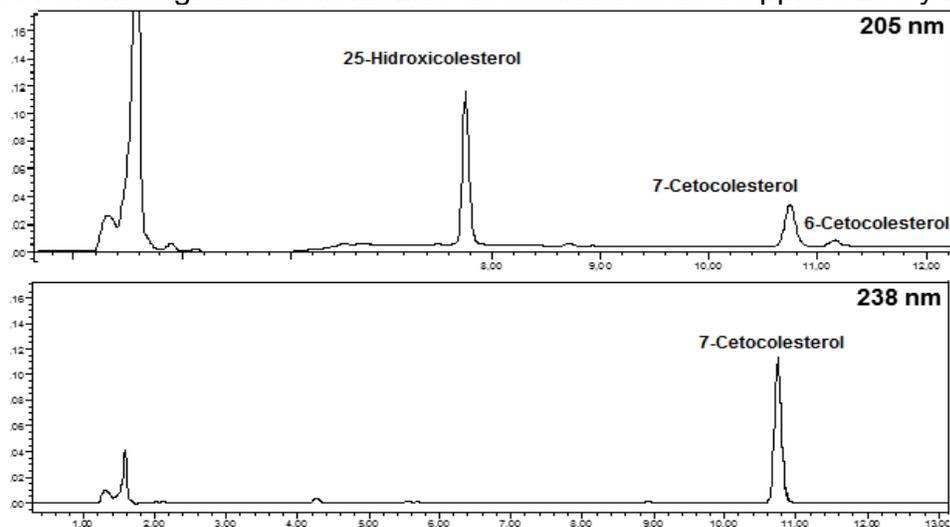
Tabla 11: Condiciones de HPLC en fase reversa para el análisis de COPs

Inyección ( $\mu\text{L}$ )	20
Fase móvil	Isocrática ACN:AGUA
Detector	PDA
Composición (V/V)	90:10
$\lambda$ (nm)	25-Hidroxy, 6-Ceto: 205 7-Ceto: 238 Colesterol: 205
Flujo (mL/s)	1,5

Fuente: Esta Investigación

Trabajando en éstas condiciones se obtuvo cromatogramas como el que se muestra en la Figura 17, donde puede observarse que la línea base se comporta de manera estable y que los picos están bien definidos, principalmente en el caso del 25-hidroxicolesterol a 205 nm y 7-cetocolesterol a 238 nm, respectivamente.

Figura 17: Cromatograma de la mezcla de estándares de 10 ppm a 205 y 238 nm



Fuente: Esta Investigación

Los parámetros que describen la separación cromatográfica de los COPs en las condiciones establecidas y con sus respectivas fórmulas de cálculo se presentan a continuación.

Tabla 12: Parámetros de caracterización de los picos Cromatográficos

COPs	Ancho de Pico	Factor de Capacidad	Resolución	Factor de Selectividad
	(min)	$\frac{t_r - t_m}{t_m}$	$\frac{2 \Delta t_r}{\Sigma W}$	$\frac{k'_S}{k'_A}$
25-OH	0,1983	4,54	14,53	1,47
7-Ceto	0,2133	6,68		
6-Ceto	0,3183	6,97		

Valores medios con n=5

Fuente: Esta Investigación

Los factores de selectividad fueron mayores a la unidad indicando que la columna ofrece buena separación de los analitos independientemente del grado de ensanchamiento de las bandas<sup>87</sup>. Los factores de resolución, indican que los picos cromatográficos se separaron satisfactoriamente, teniendo como límite mínimo de aceptación el valor de 1,5 recomendado por Skoog.<sup>88</sup>

#### 4.1.2 Evaluación del Método

##### 4.1.2.1 Curvas de Calibración

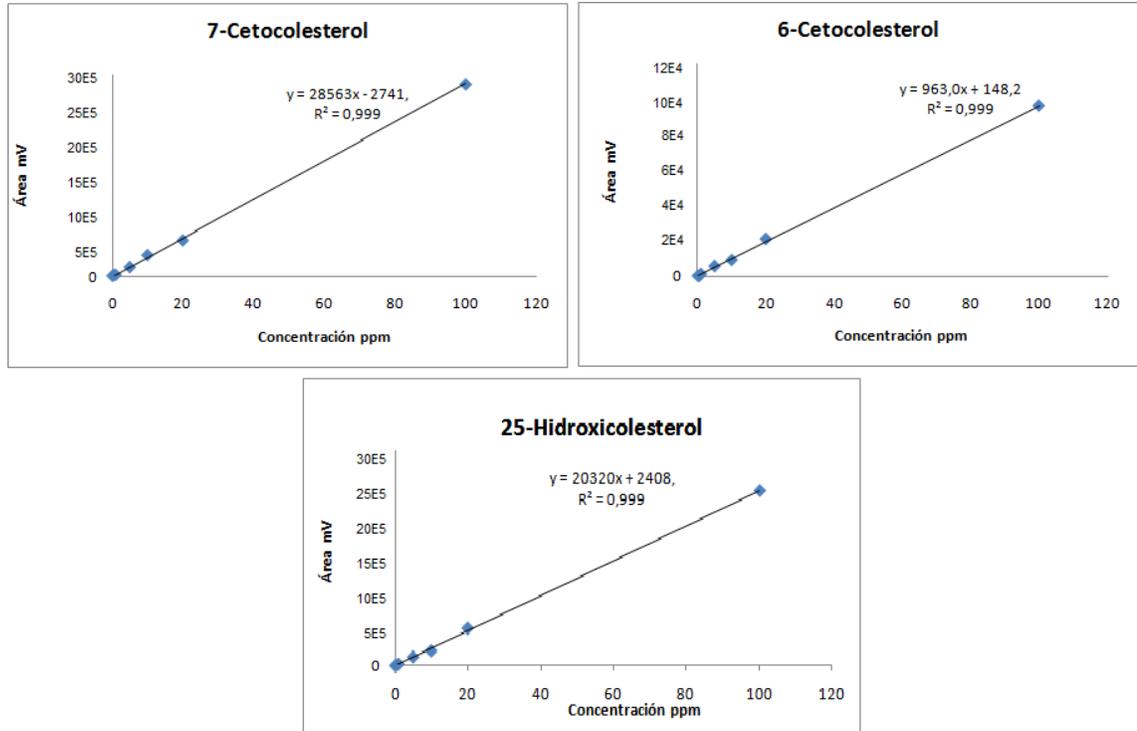
Con los datos obtenidos en los análisis cromatográficos de las diferentes concentraciones realizadas con las mezclas de estándares se graficaron las curvas de calibración para cada compuesto con el fin de determinar la linealidad del método, ajustando estas curvas por el método de los mínimos cuadrados.

<sup>87</sup> Quattrocchi, P. Op. Cit., p 322

<sup>88</sup> Skoog, D. Op. Cit., p 746

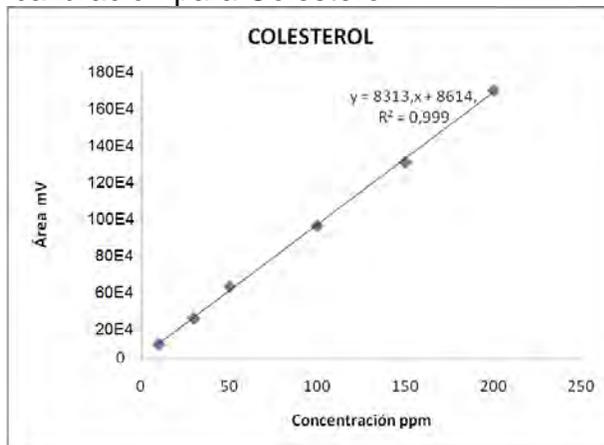
\*\* Expresado como porcentaje de recuperación

Gráfico 1: Curvas de calibración para COPs



Fuente: Esta Investigación

Gráfico 2: Curva de calibración para Colesterol



Fuente: Esta investigación

Con respecto a las curvas de calibración, el rango dinámico lineal para cada estándar corresponde al intervalo donde la concentración respecto al área es directamente proporcional. De esta manera se toman los valores que cumplen

esta propiedad. Por tal razón, para los óxidos de colesterol el rango lineal fue de 0.1 – 100 ppm, para el colesterol fue de 10 - 200 ppm, respectivamente. En la tabla 13 se presentan las ecuaciones de la recta de las curvas de calibración para los estándares junto con los factores de linealidad.

Tabla 13: Ecuaciones de las curvas de calibración y factores de linealidad para COPs y colesterol.

Componente	Ecuación	R <sup>2</sup>	tr <sub>exp</sub>	t 95%	Comparación
25-OH	Y=20320 X+2408	0.9990	70.68	2.5706	70.68 >>2.5706
6-Ceto	Y=963 X+148.2	0.9995	70.68	2.5706	70.68 >>2.5706
7-Ceto	Y=28563 X-2741	0.9997	91.26	2.5706	70.68 >>2.5706
Colesterol	Y=8313 X+8614	0.9990	44.69	2.7705	44.69 >>2.7765

n=3

Fuente: Esta Investigación

Los factores de correlación encontrados son cercanos a 1 y los valores de t teóricos (95%) para la prueba de t de student, son menores al valor experimental lo que indica que la regresión lineal confirma que los valores del área para cada óxido de colesterol son linealmente dependiente de la concentración; igualmente se comprobó que hay una correlación significativa al calcular el valor de t<sup>89</sup>.

#### 4.1.2.2 Límite de Detección y Límite de Cuantificación

Las pendientes de las rectas de regresión, reportadas en la Tabla 14 pueden determinar la sensibilidad de detección de cada óxido de colesterol, la cual corresponde a la mínima cantidad de analito que puede producir un resultado significativo. Los parámetros utilizados para determinar la sensibilidad son: límite de detección y límite de cuantificación<sup>90</sup>.

Es preciso aclarar que los compuestos de interés estudiados se determinan a diferente longitud de onda, para 25-Hidroxicolesterol, 6-Cetocolesterol y colesterol a 205 nm y para 7-Cetocolesterol a 238 nm respectivamente.

<sup>89</sup> Miller, J. Estadística quimiometría para química analítica. Madrid. Prentice may. 2002., p 91

<sup>90</sup> Quattrocchi, O. Andrizzi, S. Laba, R. Introducción a la HPLC, aplicación y práctica, análisis cualitativo. Editorial farro. S.A. Buenos Aires. 1992. 407 p

Tabla 14: Límites de Detección y Límites de Cuantificación

COMPUESTO	Área media $\mu\text{V}$	S	RSD %	Pendiente <sup>b</sup>	LD $\mu\text{g/L}$	LQ $\mu\text{g/L}$
25-OH	10,69	5,4	0,51	20320	1,06	2,91
6-Ceto	10,69	5,4	0,51	963	2,2	6,10
7-Ceto	97,3	4,36	4,48	28563	7,80	23
Colesterol	15,15	10,98	7,24	8313	1,80	14

n= 3

b: ( $\text{mV}\cdot\text{L}\cdot\text{mg}^{-1}$ )

Fuente: Esta Investigación

Según los datos de la tabla anterior, el equipo detecta concentraciones por debajo de los  $\text{mg/L}$  presentando menor límite de detección el 25-Hidroxicolesterol; en resumen, el método propuesto presenta bajos LD y LC lo cual puede usarse para análisis de trazas de estos compuestos en muestras de alimentos. Por otra parte, Investigaciones realizadas en diferentes matrices como huevo, leche y aceite de oliva, aplican metodologías cuyos valores de LD y LC oscilan entre 0,01 y 0,03  $\mu\text{g/L}$ , demostrando la versatilidad del método para compuestos presentes a concentraciones muy bajas. Otros estudios incluyen parámetros de validación en muestras de alimentos mostrando límites de detección dentro del intervalo de 0,5 – 3  $\mu\text{g/L}$  para productos de oxidación del colesterol<sup>91,92</sup>.

Por consiguiente, dado que los límites de detección y cuantificación son importantes en un trabajo, generalmente se efectúan para análisis de impurezas, trazas o cuando el rango analítico se encuentra muy próximo al límite de detección<sup>93</sup> como en el caso de los COPs, cuyas concentraciones en alimentos preparados solo se conoce que se forman en cantidades muy pequeñas, incluso en algunos alimentos crudos, no obstante, los estudios realizados hasta el momento no ofrecen conclusiones precisas en cuanto a la relación entre el tipo de carne o alimento y el grado de oxidación del colesterol del mismo, ya que la formación de estos compuestos varía, tanto por la composición del alimento, como también por las diferencias de sensibilidad de la técnica aplicada para su análisis.<sup>94</sup>

#### 4.1.2.3 Precisión y Límites de Confianza

Las tablas 15 y 16 presentan la repetibilidad y reproducibilidad de los analitos de interés, 25-hidroxicolesterol, 6-Cetocolesterol y 7-Cetocolesterol.

<sup>91</sup> Carreño, M. Op. Cit., p 61

<sup>92</sup> Daneshfar, J. Op. Cit., p456

<sup>93</sup> Quattrocchi, O. Op. Cit., p 317

<sup>94</sup> Gil, M. Op. Cit., p 32

Tabla 15: Repetibilidad de los COPs

Inyección	25-OH		6-Ceto		7-Ceto	
	Área	Tr	Área	Tr	Área	Tr
1	459497	7,754	28740	11,161	763159	10,745
2	459765	7,783	28337	11,124	770984	10,88
3	453655	7,750	28412	11,139	754543	10,728
4	459876	7,813	27654	11,128	763490	10,870
5	456606	7,743	27990	11,129	769085	10,716
6	452900	7,792	28439	11,170	779860	10,991
7	458767	7,744	28015	11,122	762868	10,711
8	450000	7,836	27909	11,134	764231	10,911
9	455789	7,792	28290	11,130	761300	10,716
Media	456317,22	7,779	28198,44	11,137	765502,22	10,08
S	3530,21	0,033	331,97	0,017	7114,16	0,106
RSD, %	0,77	0,420	1,17	0,150	0,93	0,980
L. confianza	7,779 ± 0,025		11,137±0,013		10,859± 0,081	

Tr: tiempo de retención

S: desviación estándar

L.C. al 95%

Fuente: Esta Investigación

Tabla 16: Reproducibilidad de los COPs

Inyección	25-OH		6-Ceto		7-Ceto	
	Área	Tr	Área	Tr	Área	Tr
Día 1	517701	7,798	22475	11,54	836906	10,75
Día 2	517974	7,784	22421	11,53	832713	10,72
Día 3	516280	7,776	22501	11,129	836165	10,81
Día 4	516217	7,770	22651	11,14	832590	10,82
Día 5	519005	7,796	22956	11,135	832901	10,79
Media	517615,4	7,784	22600,8	11,128	834255	10,818
S	1509,7	0,012	216,1	0,006	2101,14	0,022
RSD, %	0,220	0,157	0,950	0,054	0,25	0,200

Tr: tiempo de retención

S: desviación estándar

Fuente: Esta Investigación

Según los resultados, las mediciones de los tiempos de retención para cada COPs evaluados son confiables ya que los RSD (%) se encuentran en el rango permitido en todos los casos<sup>95,96</sup>. Por otra parte, la masa relativa del analito y la complejidad

<sup>95</sup> Ibid., p 317

de la matriz también es de importancia para el análisis de trazas o para bioensayos en los cuales las concentraciones son relativamente bajas y en donde no puede ser posible la precisión indicada, resultando apropiados CV (%) de 5%, 10% e incluso valores aun mayores<sup>97</sup>.

#### 4.1.2.4 Recuperación

Se utilizó una muestra de costilla cruda sin enriquecer y otra enriquecida con 50 µL de una solución de 20 ppm de la mezcla estándar, sometiendo a extracción de COPs, (ver anexo A).

A continuación se presentan los resultados de la recuperación de los óxidos de colesterol para la muestra de carne de cerdo.

Tabla 17: Porcentajes de recuperación

Inyección	25-OH		6-Ceto		7-Ceto	
	Área <sub>S</sub>	Área <sub>E</sub>	Área <sub>S</sub>	Área <sub>E</sub>	Área <sub>S</sub>	Área <sub>E</sub>
1	34511	125183	ND	3989	145670	255291
2	34449	125410	ND	3799	145679	255998
3	34509	125167	ND	3679	147101	255499
Media	34489,67	125253,33	-	3822,33	146150	255596
S	35,23	135,91	-	156,31	823,60	363,34
RSD	0,10	0,01	-	4,08	0,56	0,14
R, %	101,9 %		95,0 %		98,2 %	

S: sin enriquecer

E: enriquecida

ND: No Detectado

Fuente: Esta Investigación

El método provee buenos porcentajes de recuperación con coeficientes de variación inferiores al 5 %, lo cual se considera aceptable para el método utilizado para el análisis de COPs por HPLC.

## 4.2 PARAMETROS BROMATOLÓGICOS DE CARNE DE CERDO

Se determinaron algunos parámetros bromatológicos de los alimentos tales como agua, lípidos, hierro y colesterol, en muestras sin preparar, debido a que los COPs están incluidos en la fracción lipídica, su formación podría estar relacionada con la concentración de estos parámetros. Las tablas 18 y 19 resumen los valores para

<sup>96</sup> Ibid., p 319

<sup>97</sup> Ibid., p 137

cada parámetro bromatológico tanto para carne cruda, como para carne ya preparada en los dos bloques.

Tabla 18: Parámetros bromatológicos de carne de cerdo cruda

Muestra	Agua, (%)		Lípidos, (%)		Hierro (%)	
	Media <sup>a</sup>	RSD <sup>b</sup>	Media	RSD	Media	RSD
Lomo	66,4	4,9	12,3	4,02	0,75	1,70
Pierna	74,2	4	3,16	4,92	1,52	0,84
Costilla	71,8	2,56	6,88	2,47	1,02	1,25

<sup>a</sup> Valores medios

<sup>b</sup> Desviación estándar relativa, %, n=2

Fuente: Esta Investigación

Tabla 19: Parámetros bromatológicos de frito pastuso.

Experimento <sup>a</sup>	Agua, (%)		Lípidos, (%)		Hierro, (%)	
	Media <sup>b</sup>	RSD <sup>c</sup>	Media	RSD	Media	RSD
A1	48,7	4,36	9,38	0,75	0,6	2,8
B1	50,5	3,36	11,2	4,42	3	4,2
C1	50,4	3,65	14,2	4,48	1,4	3,0
D1	59,7	3,32	6,21	4,62	0,6	3,5
E1	52,8	2,41	15,7	4,32	0,6	4,0
F1	43,3	4,57	11,5	3,79	0,6	2,6
G1	52,9	3,21	11,5	3,69	0,8	2,7
H1	54,5	3,37	10,8	4,03	0,8	3,4
I1	59,9	3,31	14,8	3,48	1,4	4,0
J1	48,9	2,60	18,5	3,44	0,3	4,2
A2	43,2	4,58	10,5	2,73	4	3,2
B2	36,6	4,64	27,4	2,48	2,6	2,7
C2	33,2	4,70	16,2	1,20	2,3	3,1
D2	41,5	4,77	20,5	2,07	1,2	3,5
E2	42,6	2,99	26,4	1,65	2,7	2,6
F2	47,8	4,14	6,0	4,78	1,5	3,8
G2	53,2	3,19	8,78	4,82	0,8	3,0
H2	52	4,35	8,79	4,84	1	2,8
I2	47,7	4,45	11,9	3,66	1,7	3,3
J2	47,8	2,07	20,7	2,10	2,3	3,7

<sup>a</sup> Ensayos etiquetados según diseño experimental para bloque 1 y 2

<sup>b</sup> Valores medios, %

<sup>c</sup> Desviación estándar relativa; % n=2

Fuente Esta Investigación

El contenido de agua es un parámetro importante en la determinación de COPs ya que podría intervenir en el proceso de formación de óxidos de colesterol, tanto en el proceso de preparación, como en el almacenado. En la tabla anterior puede observarse que las muestra de carne de los bloques 1 y 2 poseen menos concentración de agua que la muestras crudas, ya que en el proceso de preparación se pierden tanto agua como otros compuestos propios de la carne, estos valores oscilan entre 43,3 – 59,9 % en el bloque 1 y de 33,2 - 52 % para el bloque 2.

La fracción lipídica varió considerablemente entre las muestras de carne cruda y carne preparada ya que en el proceso de preparación la pérdida de agua debería incrementar la concentración de la fracción lipídica, pero como la presencia de ácidos grasos incrementa la acción oxidativa del colesterol, las reacciones ocurridas en las diferentes muestras podría explicar este fenómeno; De igual forma, tanto la fracción lipídica como el tratamiento de procesado y/o conservación a que sea sometida la carne, pueden ser los principales factores condicionantes del nivel de oxidación lipídica y del nivel de formación de oxisteroles.

El contenido de hierro en la cocción del alimento causa su liberación de las hemoproteínas y en sistemas lipídicos, este y otros metales se ubican en la interfase aceite-agua o en la solución acuosa formando complejos con el grupo carboxilo de los ácidos grasos libres presentes, además, descomponen los hidroperóxidos formando los radicales alcoxilo los cuales son activos iniciadores de la lipoperoxidación al igual que la mezcla de Fe libre y proteínas desnaturizadas por el calor constituyendo un efectivo catalizador no enzimático de la de la lipoperoxidación<sup>98</sup>.

#### 4.3 NIVELES DE COLESTEROL Y COPs EN LOS INSUMOS Y EN EL FRITO PASTUSO

##### 4.3.1 *Colesterol en Materias Primas*

La determinación de colesterol y óxidos de colesterol en materias primas como carne cruda y grasa o aceite usados, es de gran importancia para este estudio ya que es necesario conocer sus concentraciones y así determinar el efecto que tienen los diferentes procesos de preparación en la oxidación del colesterol. A partir de la ecuación para la curva de calibración del colesterol, se realizó la cuantificación en cada una de las muestras, (Anexo B).

---

<sup>98</sup> Terrasa A. Op.Cit., p. 12

Tabla 20: Concentración de colesterol en materias primas

Muestra	Colesterol, (mg/g)	
	Media <sup>a</sup>	RSD <sup>b</sup> , %
Lomo	0,0847	1,74
Pierna	0,2194	2,96
Costilla	0,3542	2,53
Manteca de cerdo	0,2730	2,97
Vegetal Nuevo	0,1889	3,42
Vegetal Reutilizado	0,1165	4,61

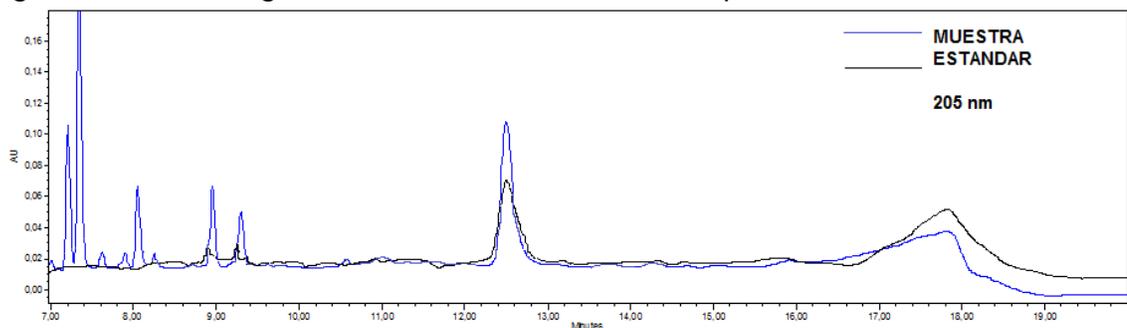
<sup>a</sup> Valores medios

<sup>b</sup> Desviación estándar relativa

Fuente: Esta investigación

Como puede observarse, los contenidos de colesterol para las piezas de cerdo son coherentes con los datos de la tabla de composición de alimentos colombianos reportada por el bienestar familiar (tabla 2), ya que, en orden decreciente la mayor cantidad de colesterol se obtuvo para la pieza de costilla y la menor cantidad fue para el lomo. Por otra parte, teniendo en cuenta los análisis de colesterol en aceites y grasa, se puede observar que la muestra de manteca de cerdo obtuvo la mayor cantidad de Colesterol, mientras que la menor cantidad se encuentra en el aceite vegetal. De igual manera, es interesante destacar los resultados obtenidos para la muestra de aceite reutilizado ya que al parecer los procesos de reutilización del aceite para la fritura de la carne contribuyó en el incremento del colesterol en cada fritura, mediante absorción de la grasa en la muestra analizada.

Figura 18: Cromatograma de colesterol en materias primas



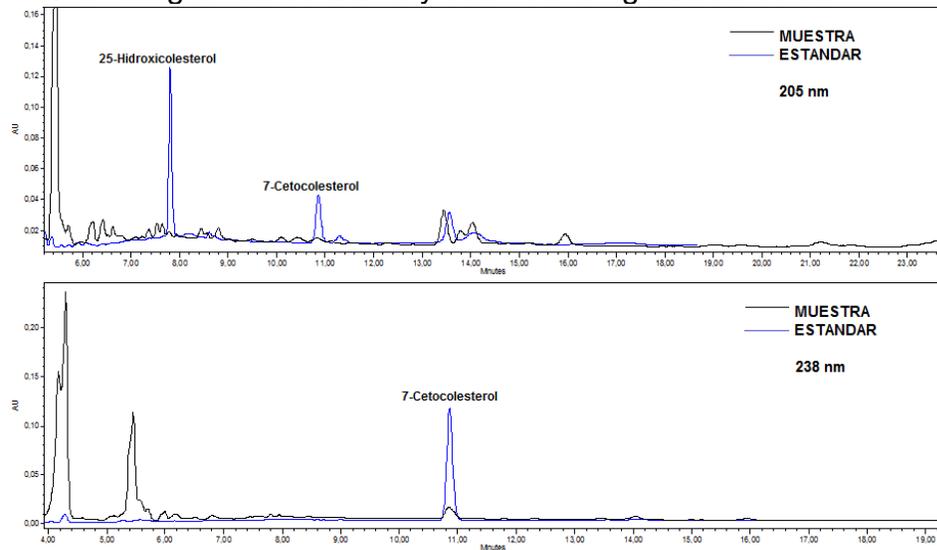
Fuente: Esta Investigación

#### 4.3.2 COPs EN MATERIAS PRIMAS

Al igual que en el apartado anterior, las concentraciones de COPs iniciales determinan la formación de estos compuestos en los procesos de preparación de

frito pastuso expuestos en el diseño experimental. La importancia del estudio en este punto es con el fin de conocer la calidad de la carne que el consumidor está adquiriendo y como se describió en apartados anteriores, el colesterol es muy sensible a la oxidación en condiciones determinadas, por ello, Nam et al.<sup>99</sup>, en sus publicaciones reportan que han detectado cantidades apreciables de 7 $\alpha$ - y 7 $\beta$ -hidroxicolesterol y de 7-Cetocolesterol en hamburguesas frescas inmediatamente antes de ser almacenadas. Por otra parte, Addis et al.<sup>100</sup> y Pie et al.<sup>101</sup> concluyeron que los niveles de COPS en carne fresca son mínimos o inexistentes, a menos que estos alimentos estén expuestos a condiciones de almacenamiento o de conservación no adecuados.

Figura 19: Cromatogramas de COPs y estándar en grasa de cerdo



Fuente: Esta Investigación

En la figura 19 podemos observar el cromatograma para manteca de cerdo, en el cual se puede ver que la concentración de 25-Hidroxicolesterol es muy pequeña en comparación con la de 7-Cetocolesterol.

A partir de la ecuación para la curva de calibración de cada óxido de colesterol se realizó la cuantificación en cada una de las muestras, (Anexo C).

<sup>99</sup> Nam K.C., Du M., Jo C., Ahn D.U. 2001. Cholesterol oxidation products in irradiated raw meat with different packaging and storage time. *Meat Sci.* 58: 431-435

<sup>100</sup> Addis, P. Op. Cit. 98

<sup>101</sup> Pie, J. Op. Cit., p 973

Tabla 21: Concentración de COPs en materias primas

MUESTRA	COMPUESTO	µg/g	RSD <sup>a</sup>	MUESTRA	COMPUESTO	µg/g	RSD
G. cerdo	25-OH	0,0046	2,8	Lomo	25-OH	ND	ND
	6-Ceto	ND	ND		6-Ceto	ND	ND
	7-Ceto	0,1450	2,5		7-Ceto	0,0851	1,8
v. nuevo	25-OH	ND	ND	Pierna	25-OH	ND	ND
	6-Ceto	ND	ND		6-Ceto	ND	ND
	7-Ceto	ND	ND		7-Ceto	ND	ND
v. reutilizado	25-OH	0,0363	4,1	Costilla	25-OH	0,0658	2,3
	6-Ceto	ND	ND		6-Ceto	ND	ND
	7-Ceto	0,0133	ND		7-Ceto	0,2167	1,5

n=2

<sup>a</sup> Desviación estándar relativa

ND: no detectado

Fuente Esta Investigación

En cuanto a los resultados obtenidos hubo diferencia significativa entre las piezas de carne de cerdo y entre las muestras de grasa y aceite, observando que el 6-Cetocolesterol no se detectó en ninguna de las muestras, en cambio el 7-Cetocolesterol y el 25-Hidroxicolesterol, se presentaron a muy bajas concentraciones. La presencia de estos compuestos a bajas concentraciones puede estar relacionada a posibles alteraciones en las condiciones de almacenaje de las piezas de cerdo antes de ser adquiridas (muestras comerciales) de las cuales no se conoce con exactitud en qué medida la congelación habría influido en el nivel de COPs en la materia prima inicial. Por otra parte, investigaciones realizadas en carnes de cerdo refrigeradas a 4 °C por 10 días, el 7-ceto estuvo siempre presente;<sup>102</sup> Kowale et al.,<sup>103</sup> encontraron 10,44; 11,93 y 12,29 µg/g de 7-cetocolesterol en carne de cerdo fresco y refrigerado a 4°C en un periodo de 0, 3 y 6 días respectivamente, y a -10°C encontraron 13, 14,18 y 15,6 µg/g en un periodo de 30, 60 y 90 días respectivamente; además, en alimentos frescos pero con fechas vencidas los contenidos de COPs fueron considerables<sup>104</sup>.

#### 4.4 CUANTIFICACIÓN DE COLESTEROL Y COPS EN FRITO PASTUSO

Como se mencionó en la metodología, los experimentos realizados en este trabajo fueron 9 con un experimento central y por duplicado, generando dos boques, cada

<sup>102</sup> Maraschiello C., García Regueiro J.A., Esteve E. 1997. La oxidación del colesterol y su influencia en la calidad de la carne y productos derivados. Eurocarne 53: 67-74.

<sup>103</sup> Kowale, B. Rao, V. Babu, N. Sharma, N. Meat Sci. 1996, 43., p 195

<sup>104</sup> Velarde, E. Gonzales, A. Colesterol y óxidos de colesterol en carne de pollo. Revista de química. Diciembre de 2006. 11-20 p

uno con 10 experimentos totalmente aleatorizados. En la tabla 22 se presenta los experimentos clasificados desde la A hasta la J, describiendo en cada uno la pieza de carne, el aceite o grasa y el tipo de preparación utilizada para la preparación de frito pastuso.

Tabla 22: Clasificación de los experimentos en la preparación de frito pastuso

Experimento	Tipo de Preparación	Pieza de Carne	Grasa o Aceite
A	Carne adobada minutos antes de la fritura y frita directamente	Lomo	Gs
B	Carne adobada minutos antes de la fritura y frita directamente	Costilla	Vn
C	Carne adobada minutos antes de la fritura y frita directamente	Costilla	Gs
D	Carne adobada minutos antes de la fritura, cocción por 30 min y fritura por 15 min	Pierna	Vr
E	Carne adobada un día antes, cocción por 30 min y fritura por 15 min	Costilla	Vn
F	Carne adobada minutos antes de la fritura y frita directamente	Lomo	Vn
G	Carne adobada un día antes, cocción por 30 min y fritura por 15 min	Lomo	Gs
H	Carne adobada un día antes, cocción por 30 min y fritura por 15 min	Lomo	Vn
I	Carne adobada minutos antes, cocción por 30 min y fritura por 15 min	Pierna	Vr
J	Carne adobada un día antes, cocción por 30 min y fritura por 15 min	Costilla	Gs

Donde, Gs: manteca de cerdo pura, Vn: aceite vegetal nuevo, Vr: aceite vegetal reutilizado

Fuente: Esta investigación

#### 4.4.1 CONTENIDOS DE COLESTEROL EN FRITO PASTUSO

Los resultados expuestos por varios autores han demostrado que la oxidación de este esteroide es evidente, aumentando significativamente las concentraciones de diversidad de óxidos de colesterol. Por otra parte, la comparación entre resultados obtenidos a igual tipo de alimento con diferentes metodologías de análisis, han puesto en manifiesto la sensibilidad de estas técnicas, debido a la formación de COPs durante el proceso de extracción y limpieza de la muestra.

Tabla 23: Concentración de colesterol en frito pastuso

Experimento	Bloque I		Bloque II	
	Media <sup>a</sup>	RSD <sup>b</sup> , %	Media	RSD, %
A	0,96	2,76	1,01	2,94
B	0,31	4,44	0,83	3,20
C	0,83	4,33	0,86	3,83
D	0,26	4,44	0,21	3,74
E	0,67	4,76	0,64	1,99
F	0,35	4,68	0,59	4,79
G	1,02	1,50	0,71	4,76
H	0,58	2,10	0,14	3,48
I	0,37	2,23	0,32	4,82
J	0,71	3,82	0,88	2,17

<sup>a</sup> Valores Medios, mg/g

<sup>b</sup> Desviación Estándar Relativa, n=2

Fuente: Esta investigación

La concentración de colesterol en carne frita aumentó significativamente en los dos bloques; cabe destacar que este fenómeno puede ser causado por la pérdida de agua ocurrida por la cocción o fritura a la cual estuvo expuesta la carne; por tal razón, teniendo en cuenta los resultados de la tabla 23, las concentraciones de colesterol estuvieron en el rango de 0,26 – 1,02 mg/g para el bloque I y de 0,14 – 1,01 mg/g para el bloque II; los experimentos que presentaron mayores concentraciones de colesterol en muestras de frito pastuso fueron para lomo y costilla que corresponde a G, A, C y J; y los valores más bajos fueron para las muestras D e I, que corresponde a pierna, respectivamente.

En resumen, las concentraciones de colesterol en las piezas de carne, se deben a que existen diferencias entre la cantidad de este compuesto en distintos músculos<sup>105,106</sup>. Estas diferencias se han relacionado principalmente con la cantidad de fibras rojas en el músculo de forma que a mayor contenido en este tipo de fibras (de menor diámetro que las blancas), mayor contenido de colesterol. También se ha relacionado la mayor riqueza en fosfolípidos en los músculos con un mayor metabolismo oxidativo, ya que el colesterol contribuye a mantener el orden de los fosfolípidos en la membrana celular<sup>107</sup>, entonces, a mayor contenido en fosfolípidos, mayor cantidad de colesterol. En definitiva, las diferencias en el tipo de fibra podría ser una de las razones importantes de la variabilidad en el

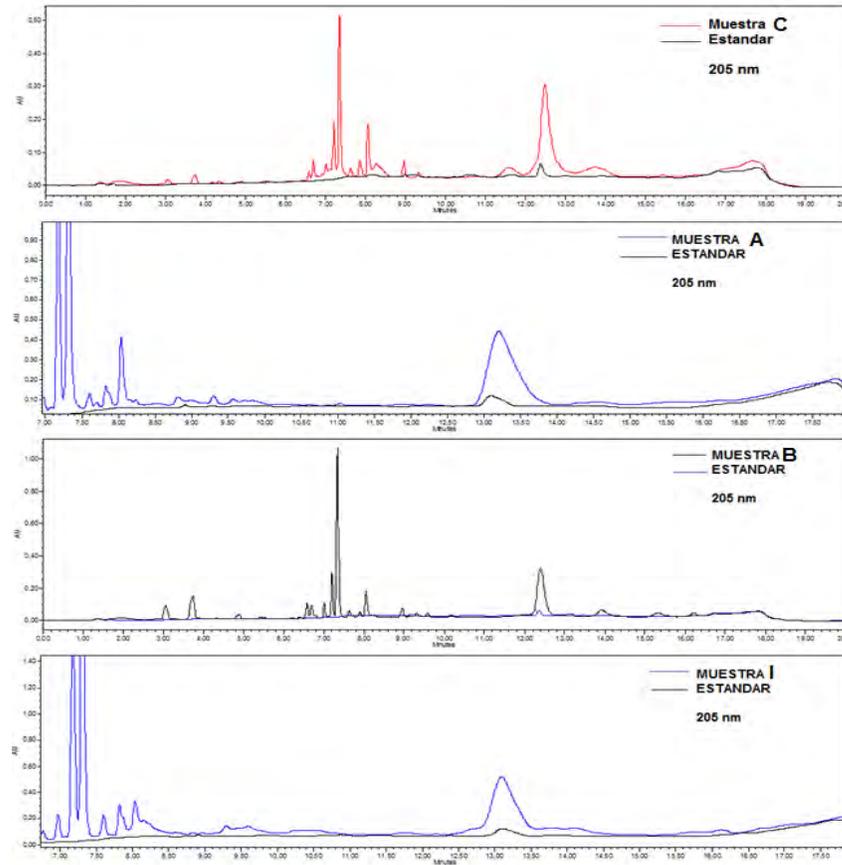
<sup>105</sup> Browning, M.A.; Huffirian, D.L.; Egbert, W.R.; Jungst, S.B. Journal of Food Science.1990, 55, 9-14.

<sup>106</sup> Fernandez,C.; Gallego,L.; López,A. XXI Jornadas Científicas de la SEOC. 1996, Logroño (España).

<sup>107</sup> Alasnier, C. Remington, H. Gandemer, G. meta science. 1996. 43. 213-224 p

contenido de colesterol y por lo tanto de COPs entre músculos de un mismo animal o especie e incluso entre el mismo musculo entre diferentes especies.

Figura 20: Cromatograma de colesterol en frito pastuso y estándar.



Fuente: Esta Investigación

#### 4.4.2 CONTENIDOS DE COPs EN FRITO PASTUSO.

Los resultados expuestos en este apartado dan a conocer el proceso de oxidación al que estuvo expuesto el colesterol, ya que el proceso de preparación de frito pastuso, fue diferente para cada experimento en cuanto a pieza de carne y aceite o grasa, debido a que la aplicación de temperaturas de cocinado, uso de ingredientes y la grasa o aceite frita en ellos, reportados en otros trabajos, acelera en gran medida las reacciones de oxidación lipídica disminuyendo en consecuencia la estabilidad oxidativa del colesterol de membrana. De hecho, diversos autores han señalado que la concentración de COPs de la carne fresca

puede incrementarse hasta 10 veces tras ser sometida a distintos tratamientos culinarios<sup>108</sup>.

Por otra parte, es necesario tener en consideración que la susceptibilidad de los ácidos grasos de membrana a sufrir reacciones de oxidación está directamente relacionada con su grado de insaturación. Los estudios realizados hasta el momento no ofrecen conclusiones precisas en cuanto a la relación existente entre el tipo de carne y el grado de oxidación del colesterol de la misma. En la tabla 24 se presenta la cuantificación de óxidos de colesterol en los 10 experimentos de los 2 bloques; tales diferencias pueden ser debidas tanto a las variaciones composicionales propias de cada paquete muscular,<sup>109</sup> como a las diferencias en la sensibilidad de la metodología aplicada. De igual forma, con los resultados de los bloques para 7-Cetocolesterol se realizó una prueba ANOVA para cada factor con el fin de determinar si existen diferencias significativas entre niveles de cada factor.

---

<sup>108</sup> Gil, M. Op. Cit., p342

<sup>109</sup> Bodwell C. Anderson B. Nutritional composition and value of meat products. En: Muscle as Food, pp. 321-360. Ed. Bechtel P. J. Academic Press. Orlando.

Tabla 24: Concentración de COPs en frito pastuso

Muestra	Compuesto	Bloque 1		Bloque 2		Muestra	Compuesto	Bloque 1		Bloque 2	
		µg/g	RSD <sup>a</sup>	µg/g	RSD			µg/g	RSD	µg/g	RSD
	25-OH	ND	ND	ND	ND		25-OH	ND	ND	ND	ND
A	6-Ceto	ND	ND	ND	ND	F	6-Ceto	ND	ND	ND	ND
	7-Ceto	0,296	1,7	0,578	2,9		7-Ceto	ND	ND	0,067	4
	25-OH	ND	ND	ND	ND		25-OH	ND	ND	ND	ND
B	6-Ceto	ND	ND	ND	ND	G	6-Ceto	ND	ND	ND	ND
	7-Ceto	0,125	4,0	0,440	2,9		7-Ceto	ND	ND	0,089	1,2
	25-OH	0,005	1,2	0,049	2,5		25-OH	ND	ND	ND	ND
C	6-Ceto	ND	ND	ND	ND	H	6-Ceto	ND	ND	ND	ND
	7-Ceto	0,376	1,5	0,940	3,7		7-Ceto	0,060	4,3	ND	ND
	25-OH	ND	ND	ND	ND		25-OH	ND	ND	ND	ND
D	6-Ceto	ND	ND	ND	ND	I	6-Ceto	ND	ND	ND	ND
	7-Ceto	0,029	4,1	0,058	4,4		7-Ceto	0,054	2,7	0,509	2,5
	25-OH	ND	ND	ND	ND		25-OH	ND	ND	ND	ND
E	6-Ceto	ND	ND	ND	ND	J	6-Ceto	ND	ND	ND	ND
	7-Ceto	0,289	2,4	0,482	3,2		7-Ceto	0,331	2,2	0,437	2,6

<sup>a</sup> Desviación Estándar Relativa

ND: No Detectado

Fuente: Esta investigación

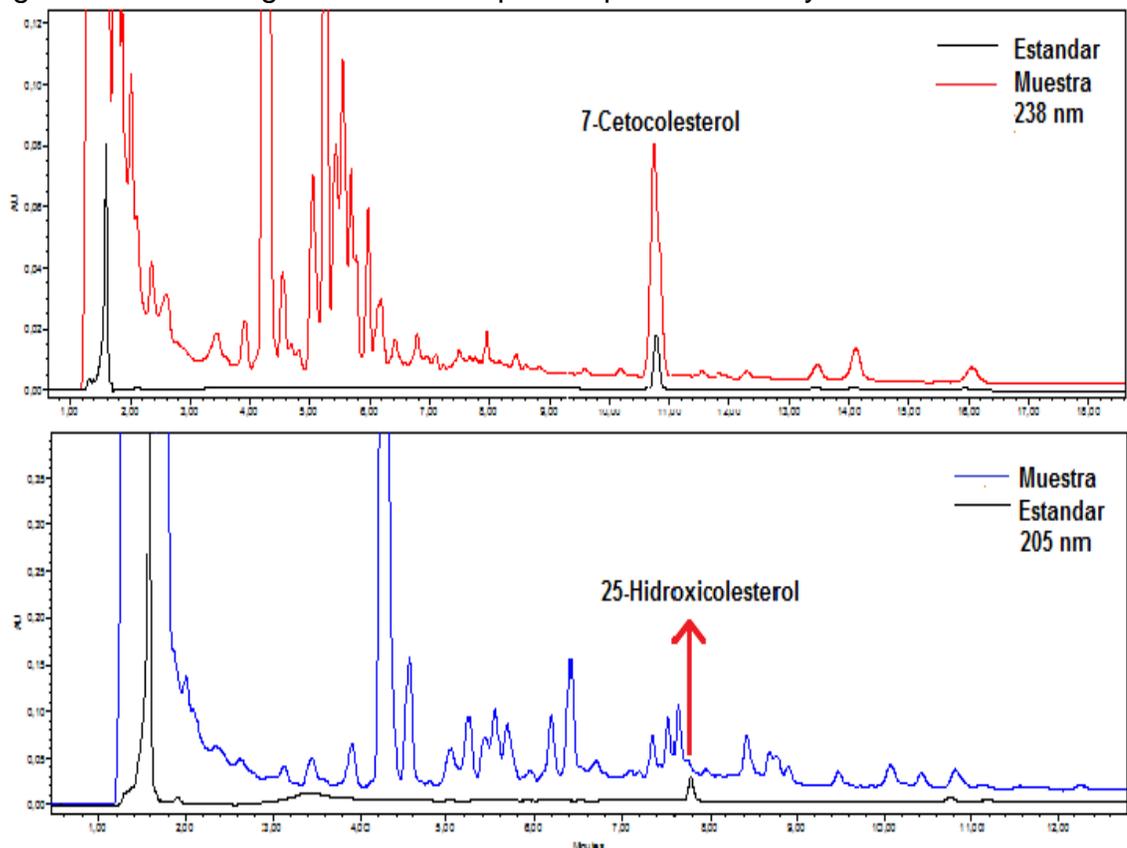
El 6-Cetocolesterol no fue detectado en ninguna de las muestras. El 25-hidroxicolesterol fue encontrado a bajas concentraciones en la muestra C, que corresponde a costilla adobada minutos antes de la preparación y frita directamente en grasa de cerdo.

#### 4.4.2.1 Preparación

El 7-Cetocolesterol fue encontrado en casi todas las muestras, Las mayores concentraciones de 7-ceto fueron obtenidas para la fritura directa de la carne (nivel -1), que corresponde a las muestras C y A respectivamente, pero las menores concentraciones fueron para el tipo de preparación en la cual el adobo fue minutos

antes de la cocción y posterior fritura (nivel 0), cuyas muestras fueron I, D y F, respectivamente, de igual forma, se obtuvieron similar comportamiento para las muestras G y H en la cual, también se utilizó cocción de la carne solo que el adobo fue un día antes de la preparación (nivel 1). Probablemente esta diferencia en las concentraciones se debe al efecto de factores como tiempo-temperatura ya que en la preparación sin cocción en agua, la carne estuvo expuesta por mayor tiempo a la temperatura de fritura que puede alcanzar valores hasta 175 °C; en la cocción y posterior fritura, la carne se expuso a temperatura de ebullición del agua y después a la fritura en aceite o grasa pero en menor tiempo. En cualquier caso, tanto las condiciones de tiempo-temperatura como la forma de preparación de alimentos, ejercen un efecto significativo sobre el grado de formación de COPs acelerando en gran medida las reacciones de oxidación lipídica disminuyendo en consecuencia la estabilidad oxidativa del colesterol de membrana<sup>110</sup>.

Figura 21: Cromatograma de COPs para experimento C2 y estándar

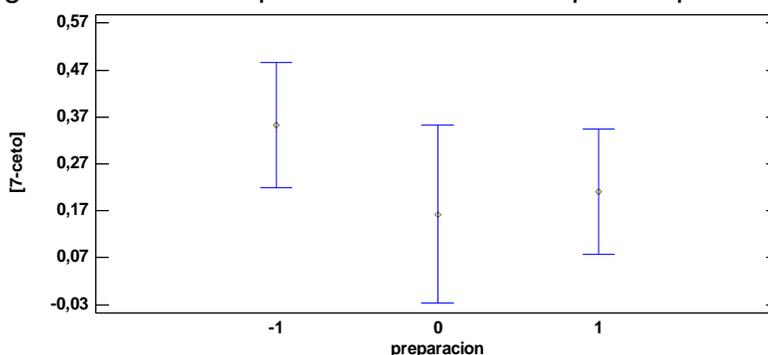


Fuente: Esta Investigación

<sup>110</sup> García-Cruset, S.; Carpenter, K.L.; Guardiola, F.; Stein, B.K. Y Mitchinson, M.J. (2001). Oxysterols profiles of normal human arteries, fatty streaks and advanced lesions. *Free Radical Res.* 53(1): 31-41.

Según el análisis de medias la razón-F (0,98) y su valor-P (0.3970) de la razón-F es mayor que 0,05; no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de 7-ceto entre un nivel de preparación y otro, con un nivel del 95,0% de confianza. El análisis de varianza confirma el supuesto descrito anteriormente, ya que el valor-P (0.643399), es mayor que 0,05 confirmando que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar, con un nivel del 95,0% de confianza, es decir que las medias son iguales. (Anexo D)

Gráfico 3: Diagrama de Medias para 7-Cetocolesterol por Preparación



Adobo un día antes + cocción + fritura = 1  
 Adobo minutos antes + cocción + fritura = 0  
 Adobo min antes y fritura directamente = -1  
 Fuente: Esta Investigación

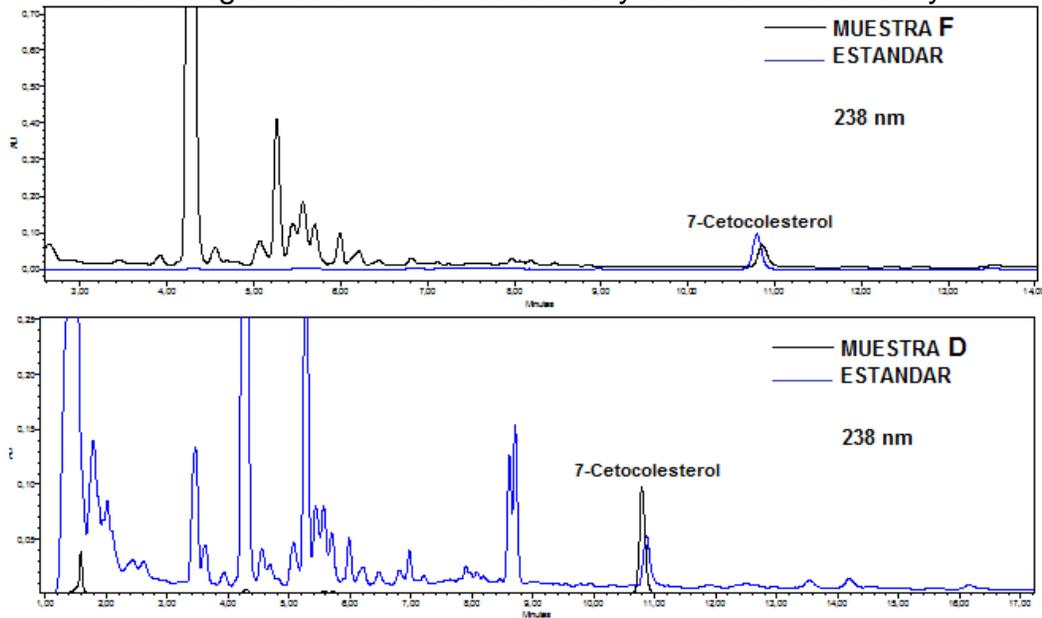
#### 4.4.2.2 Tipo de Aceite

En el análisis de COPs en insumos, se encontró que la grasa de cerdo y aceite reutilizado presentaron concentraciones apreciables de 7-Ceto pero solo se encontró una pequeña cantidad de 25-OH en grasa de cerdo. Por otra parte, en las muestras de frito pastuso las concentraciones más bajas de 7-Ceto fueron para aceite reutilizado (nivel 0), las cuales fueron D e I respectivamente y cuyos niveles de colesterol fueron los más bajos, además, como es aceite reutilizado los hidroperóxidos lipídicos generados por autooxidación de ácidos grasos poliinsaturados y los radicales alcoxilo y peroxilo generados a partir de los mismos<sup>111</sup>. posiblemente afectaron tanto al colesterol como a otros lípidos presentes; de igual forma las muestras F, H, E y B que corresponden a aceite vegetal nuevo (nivel 1), presentaron valores bajos de concentración en comparación a las tratadas con grasa de cerdo (nivel-1), encontrando los máximos niveles de concentración del oxiesterol y cuyas muestras fueron C, A y J respectivamente. Debido a que la grasa de cerdo posee ácidos grasos insaturados

<sup>111</sup> Lozada, J.J. Op. Cit. p 438

como el ácido linoleico, estos oxidan al colesterol más rápido que los aceites saturados durante el calentamiento.<sup>112,113</sup> Por otra parte, la capacidad de los aceites de cocina para inhibir la pérdida de colesterol se debe a que demasiado aceite sólo fluiría alrededor de la carne, en este caso, la degradación de colesterol sin duda disminuirá significativamente, debido a que el exceso de aceite podría formar una barrera física alrededor de la carne bloqueando el contacto del oxígeno y el colesterol<sup>114</sup>.

Figura 22: Cromatogramas de 7-Cetocolesterol y estándar muestra F y D



Fuente: Esta investigación

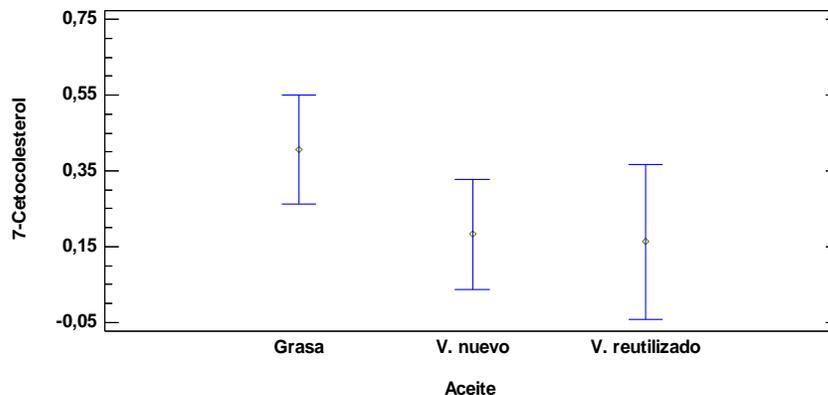
Al igual que los anteriores análisis, el diagrama de medias y los estadísticos comprueban que tampoco existen diferencias significativas entre las medias de 7-ceto entre un nivel de preparación y otro, con un nivel del 95 % de confianza. (Anexo D)

<sup>112</sup> Echarte, M., Zulet, A., and Astiasaran, I. (2001). Oxidation Process Affecting Fatty Acids and Cholesterol in Fried and Roasted Salmon. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49:5662-5667

<sup>113</sup> Tarrasa A. Op.Cit., p 12

<sup>114</sup> Zhang, T. Op. Cit ., p72

Gráfico 4: Diagrama de Medias para 7-Ceto por Tipo de Aceite.



Fuente: Esta Investigación

#### 4.4.2.3 Pieza de Carne de Cerdo

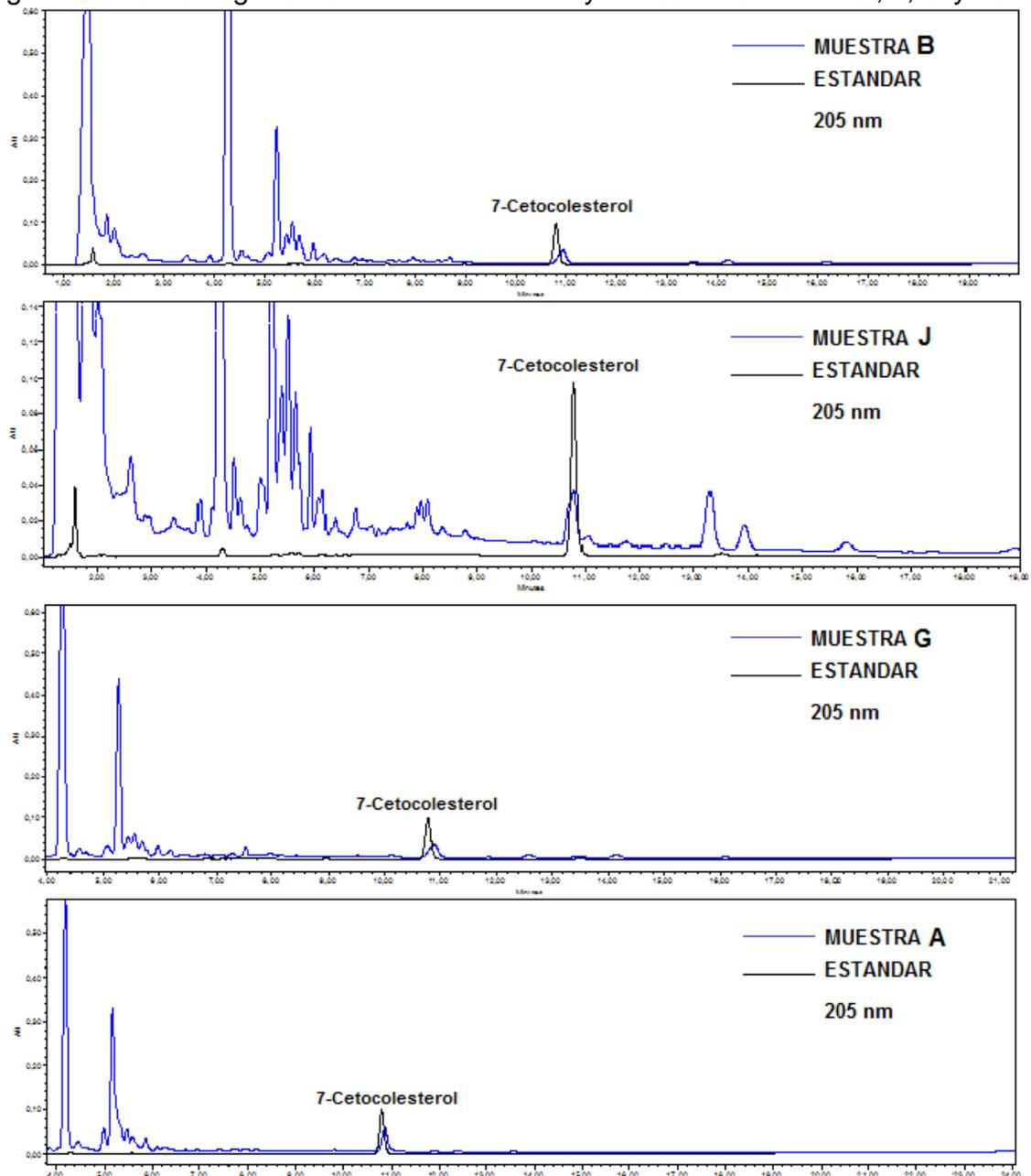
En carne de cerdo cruda, las concentraciones de COPs fueron mayores en costilla, encontrando tanto 7-Cetocolesterol como 25-Hidroxicolesterol siendo el último el de menor concentración y en la única pieza de carne que fue detectado. De igual forma, las muestras con mayores concentraciones de 7-Cetocolesterol en frito pastuso fueron para costilla cuyos niveles de colesterol y lípidos fueron los más altos en los análisis de insumos y posiblemente fueron los desencadenantes del proceso oxidativo. De igual manera, los valores más bajos se encontraron para las piezas de lomo pero aun más bajos para las piezas de pierna respectivamente. Por consiguiente, la exposición a grasas animales, condiciones de tiempo-temperatura, método de cocinado aplicado, hace que ejerza un efecto significativo sobre el grado de formación de oxisteroles, ya que en el proceso de cocinado la muestra está expuesta a una menor temperatura que la expuesta a una fritura directa. En este sentido, Nourooz-Zadeh y Appelqvist<sup>115</sup>, concluyeron que en corteza de cerdo fresca no se detectan cantidades cuantificables de óxidos del colesterol. Sin embargo, cuando ésta es sometida a fritura a 170° C se detectan las formas 7 $\alpha$ -Hidroxicolesterol y 7 $\beta$ -Hidroxicolesterol y cuando la temperatura de cocinado asciende hasta 200° C, aparecen además los óxidos 5,6 $\alpha$ -epoxicolesterol, 7-Cetocolesterol y 25-Hidroxicolesterol. De forma similar, Gil et al.<sup>116</sup> demostraron que la cantidad de oxisteroles en carne de cerdo recién cocinada a la plancha, es significativamente inferior a la cuantificada sobre muestras sometidas a cocción o asado en horno. Dicho comportamiento apoya la

<sup>115</sup> Nourooz-Zadeh J., Appelqvist L.A., Cholesterol oxides in Swedish foods and food ingredients: Fresh eggs and dehydrated egg products. J. Food Sci. 52 (1987), 57-67.

<sup>116</sup> Gil, M. Op. Cit., p 234

teoría de que la generación de óxidos de colesterol aumenta conforme se prolonga el período de calentamiento propuesta por Chien et al<sup>117</sup>.

Figura 23: Cromatograma de 7-Cetocolesterol y estándar muestras B, J, G y A.

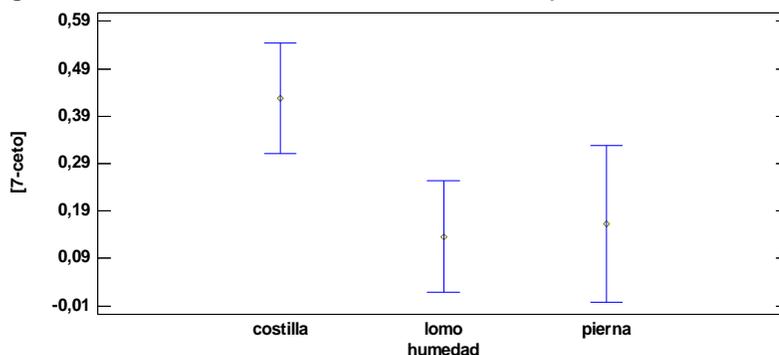


Fuente: Esta Investigación

<sup>117</sup> Chien J.T., Wang H.C., Chen B.H. Kinetic model of the cholesterol oxidation during heating. J. Agr. Food 1998. Chem. 46: 2572-2577.

Según el análisis de medias, La razón-F, que en este caso es igual a 3,90 y su valor-P es menor que 0,05 (Anexo D); indica que existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de 7-Cetocolesterol entre los niveles de humedad con un nivel del 95 % de confianza, lo cual demuestra que el uso de costilla influye significativamente en la formación de COPs, como puede observarse en el gráfico 5.

Gráfico 5: Diagrama de Medias de 7-Cetocolesterol para Humedad



Fuente: Esta Investigación

#### 4.5 IDENTIFICACION DE COPs POR GC-MS

Se realizó la identificación confirmativa de los COPs 7-Cetocolesterol y 25-Hidroxicolesterol mediante GC-MS la cual es una técnica que nos ofrece un espectro de cada compuesto; para ello se utilizó la base de la librería NIST. Este análisis se llevó a cabo en una muestra de carne costilla cruda por ser esta la que detectó la presencia de los dos analitos de estudio.

Teniendo en cuenta la relación m/z, es posible establecer el número de grupos Trimetil-Silil (TMS) que contienen los derivados de los COPs. En el caso del 25-Hidroxicolesterol, que contiene 2 radicales -OH, da lugar a un derivado con dos grupos TMS, mientras que el 7-Cetocolesterol por tener solo un radical -OH presentado un grupo TMS.

Tabla 25: Relación m/z de los Tri-Sil derivados de los COPs y sus Iones de fragmentación obtenidos de los espectros de masas.<sup>118</sup>

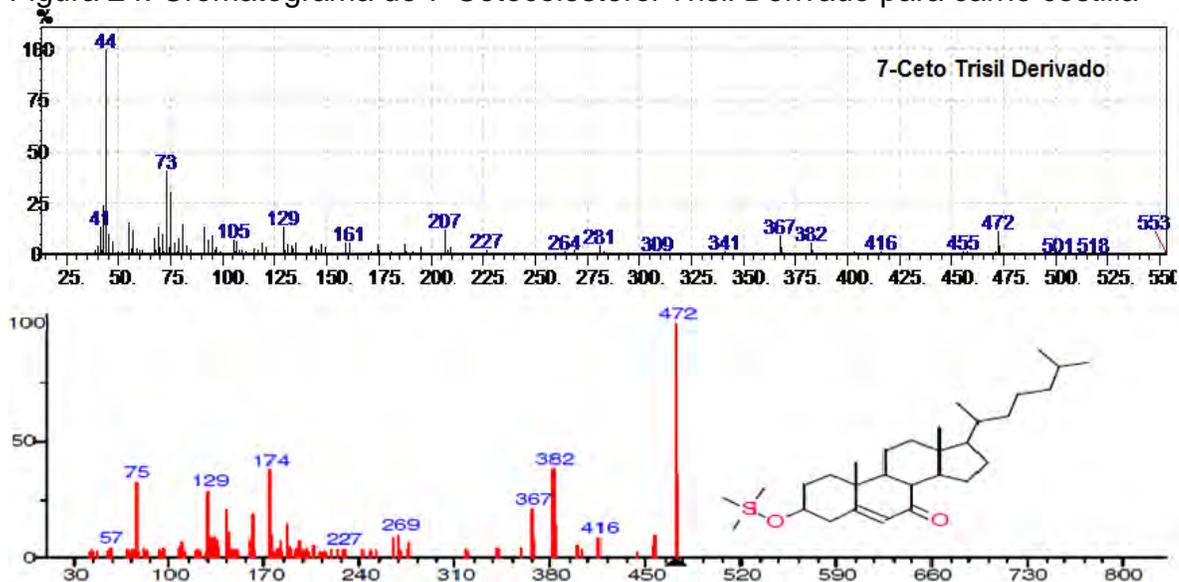
Compuesto	Relacion M/Z	Iones Fragmento
25-Hidroxicolesterol	546	456, 366, 327, 295, 271, 131, 95
7-Cetocolesterol	472	382, 367, 269, 174, 129, 75

m/z: Relación masa carga, u.m.a

FUENTE: Lozada, J.J. Determinación de óxidos de colesterol en muestras de alimentos mediante cromatografía de gases. (Tesis doctoral). 2012.

El espectro de masas obtenido para 7-Ceto en costilla cruda se confirmó por comparación al referido por la librería NIST; el ion a 472 uma, el cual corresponde al ion molecular, indica que este COP solamente reacciona con un grupo TMS. Además se detectan los iones de masa 382, 367, 264, 174 y 129 uma.

Figura 24: Cromatograma de 7-Cetocolesterol Trisil Derivado para carne costilla



A) Espectro de masas Muestra Costilla

B) Espectro de Masas Base de Datos NIST

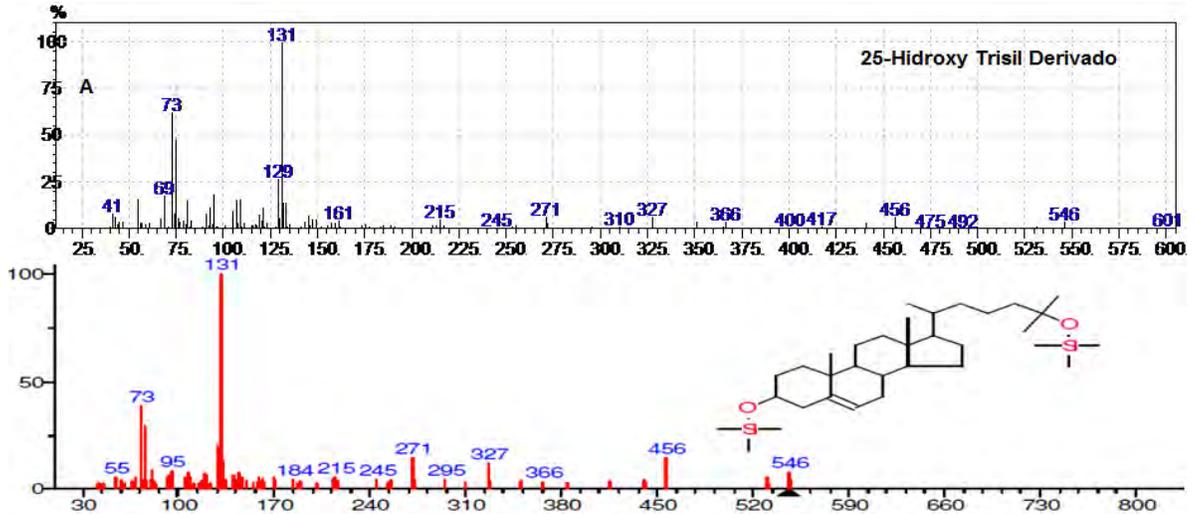
Fuente: Esta Investigación

La identificación del derivado del 25-Hidroxicolesterol se realizó por comparación entre el espectro de masas obtenido a partir de una disolución patrón y el referido por la NIST; En este caso, el espectro de masas correspondiente al trisil derivado del 25-Hidroxicolesterol; presenta una señal m/z característica del ion molecular

<sup>118</sup> Lozada, J.J. Op.Cit. p. 262

$[M^+, 546]$ , y el pico base característico corresponde a  $[M^+, 131]$ , Además, en el espectro se puede ver la presencia de algunos de los iones de fragmentación como 456, 366, 327 y 131, los cuales demuestran la presencia del compuesto de interés en la muestra.

Figura 25: Cromatograma de 25-Hidroxycolesterol Trisil Derivado para carne costilla



A) Espectro de masas Muestra Costilla  
 B) Espectro de Masas Base de Datos NIST  
 Fuente: Esta Investigación

#### 4.6 EFECTO DE LOS FACTORES EN LA FORMACIÓN DE COPs

Teniendo en cuenta la metodología y el diseño experimental completamente aleatorizado, la tabla 26 resume los experimentos realizados, frente a los valores de la variable dependiente que en ese caso es la concentración de 7-Cetocolesterol.

Tabla 26: Concentración de COPs por Factores

Bloque	Preparación	Aceite	Humedad	7-Ceto $\mu\text{g/g}$
I	-1	1	1	0,296
	-1	-1	-1	0,125
	-1	1	-1	0,376
	0	0	0	0,029
	1	-1	-1	0,289
	-1	-1	1	ND
	1	1	1	ND
	1	-1	1	0,06
	0	0	0	0,054
	1	1	-1	0,331
II	-1	1	1	0,578
	-1	-1	-1	0,440
	-1	1	-1	0,940
	0	0	0	0,058
	1	-1	-1	0,482
	-1	-1	1	0,067
	1	1	1	0,089
	1	-1	1	ND
	0	0	0	0,509
	1	1	-1	0,437

Fuente: Esta Investigación

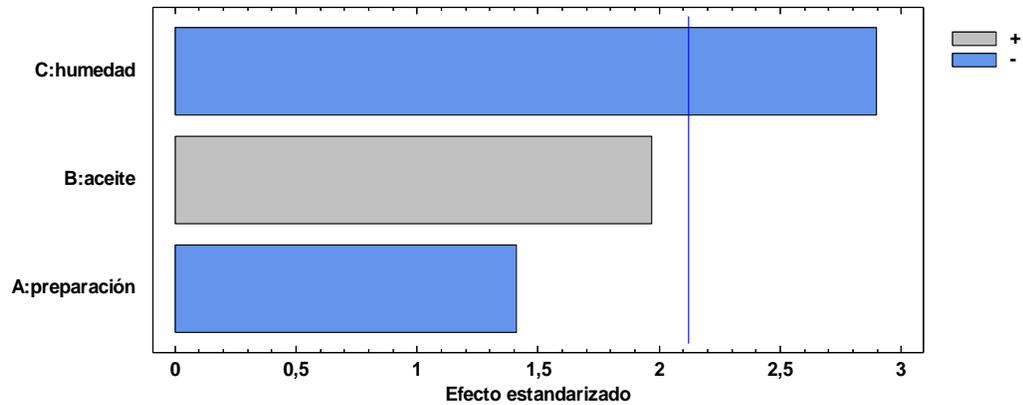
Con la tabla anterior se realizó el análisis del diseño mediante el paquete estadístico Statgraphic Centurión XVI. Según el análisis de varianza, solo uno de los factores influye en la formación de COPs (7-Ceto), en este caso, el factor humedad de la carne, ejerce una influencia negativa sobre la respuesta, cuyo valor-p de la razón F es inferior a 0,05. El gráfico 6 presenta el diagrama de Pareto obtenido para 7-Cetocolésterol.

Tabla 27: Análisis de Varianza para diseño experimental

Fuente	Razón-F	Valor-P
A:preparación	1,99	0,1776
B:aceite	3,88	0,0664
C:humedad	8,39	0,0105

Fuente: Esta investigación

Grafico 6: Diagramas de Pareto Estandarizada para 7-Cetocolesterol

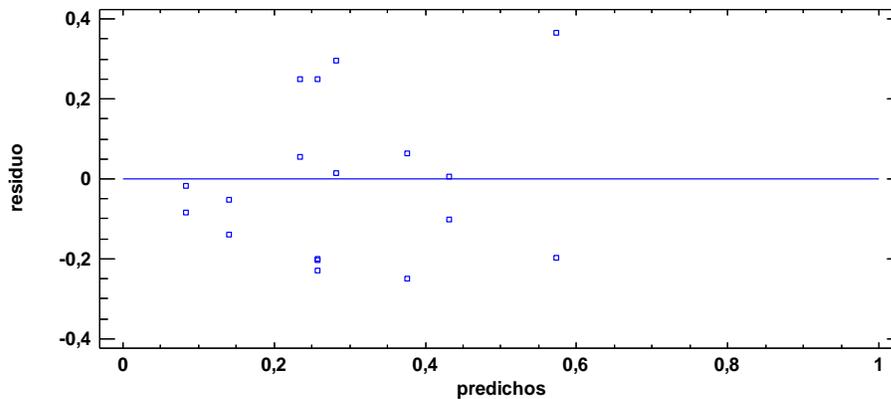


Fuente: Esta Investigación

En el grafico de Pareto se observa la influencia del factor del diseño al nivel de significancia 0,05 sobre la respuesta, además la influencia que ejerce el tipo de aceite y preparación no es significativa. Sin embargo, en el proceso de preparación y extracción de COPs, los resultados demostraron que tanto la pieza de carne como la forma de preparación influyen en gran medida en la oxidación de colesterol cuando se expone carne costilla a fritura directa en grasa de cerdo.

Por otra parte, el estadístico de Durbin-Watson que es igual a 2,04621 (valor-P=0,4809) prueba los residuos para determinar si hay alguna correlación significativa basada en el orden en que se presentan las concentraciones de 7-Ceto. Puesto que el valor-P es mayor que 5.0%, no hay indicación de autocorrelación serial en los residuos con un nivel de significancia del 5,0%.

Grafico 7: Residuos para 7-cetocolesterol



Fuente: Esta Investigación

Se puede resumir que el contenido de COPs en general, está influenciado por la pieza de carne de cerdo utilizada para el proceso, ya que la diferencia en contenidos de colesterol, agua y lípidos totales en insumos fue observada, además los resultados obtenidos para COPs confirman la oxidación de colesterol en todos los casos estudiados, sobre todo para experimentos en los que fue utilizada carne costilla, cuyos niveles de 7-Cetocolesterol fueron los más altos.

#### 4.7 ANÁLISIS DE CORRELACIÓN

Los valores de los coeficientes de correlación lineal de Pearson presentan para cada par de variables valores cercanos a 1 lo cual indica correlaciones entre algunos parámetros bromatológicos y la formación de COPs. Un valor del coeficiente de Pearson de -0,6745 indica una correlación negativa entre contenidos de agua de las muestras de carne de cerdo en insumos y las concentraciones de 7-Cetocolesterol en frito pastuso; de igual forma, una correlación positiva con lípidos totales en insumos son demostrados por el valor del coeficiente de Pearson de 0,7471, respectivamente. La tabla 28 indica la matriz de correlación de parámetros bromatológicos en la cual incluye el valor-p para cada par de variable que prueba la significancia estadística de las correlaciones estimadas, cuyos valores inferiores a 0,05 indican correlaciones significativamente diferentes de cero, con un nivel de confianza del 95,0%.

Tabla 28: Matriz de correlación de parámetros bromatológicos y 7-Cetocolesterol

Correlaciones	7-Cetocolesterol	Colesterol	Lípidos	Humedad
7-Cetocolesterol		0,4111 0,0717	0,7471 0,0002	-0,6745 0,0011
Colesterol	0,4111 <sup>a</sup> 0,0717 <sup>b</sup>		0,2268 0,3364	-0,2830 -0,2267
Lípidos	0,7471 0,0002	0,2268 0,3364		-0,7972 0,0000
Humedad	-0,6745 0,0011	-0,2830 0,2267	-0,7972 0,0000	

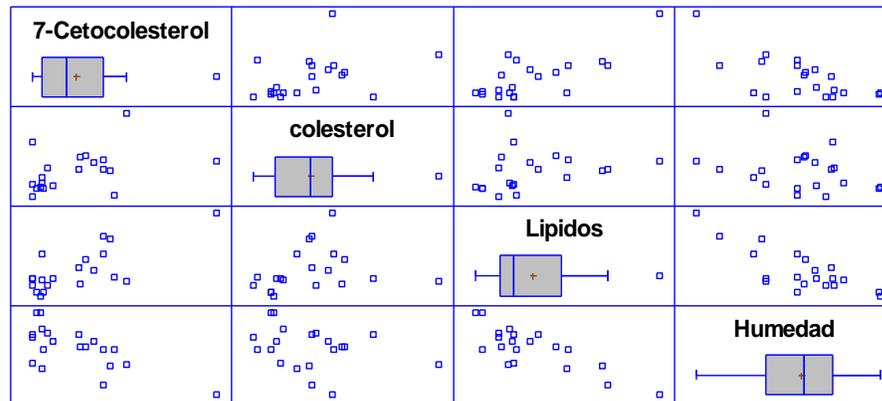
<sup>a</sup> Coeficiente de Correlación de Pearson

<sup>b</sup> Valor-p

Fuente: Esta Investigación

El gráfico 8 presenta los diagramas de dispersión de los parámetros medidos, observando claramente la correlación negativa y positiva para humedad - 7-Cetocolesterol y lípidos - 7-Cetocolesterol, respectivamente.

Gráfico 8: Diagrama de dispersión de la matriz de correlación de parámetros bromatológicos y 7-Cetocolesterol



Fuente: Esta Investigación

Por otra parte el coeficiente de correlación de Pearson para cada par de variables con respecto a factores y 7-Cetocolesterol, fue próximo a cero, lo que indica que no existen correlaciones entre los factores del diseño experimental y 7-cetocolesterol. Estos resultados vienen corroborados por los valores-p superiores a 0,05 indicando que no existen correlaciones significativas entre cada par de variables.

Tabla 29: Matriz de Correlación para factores y 7-Cetocolesterol

Correlaciones	[7-ceto]	Humedad	Aceite	Preparación
[7-ceto]		-0,2857	0,1387	-0,0500
		0,2221	0,5598	0,8341
Humedad	-0,2857 <sup>a</sup>		0,0000	0,0000
	0,2221 <sup>b</sup>	1,0000	1,0000	
Aceite	0,1387	0,0000		0,0000
	0,5598	1,0000		1,0000
Preparación	-0,0500	0,0000	0,0000	
	0,8341	1,0000	1,0000	

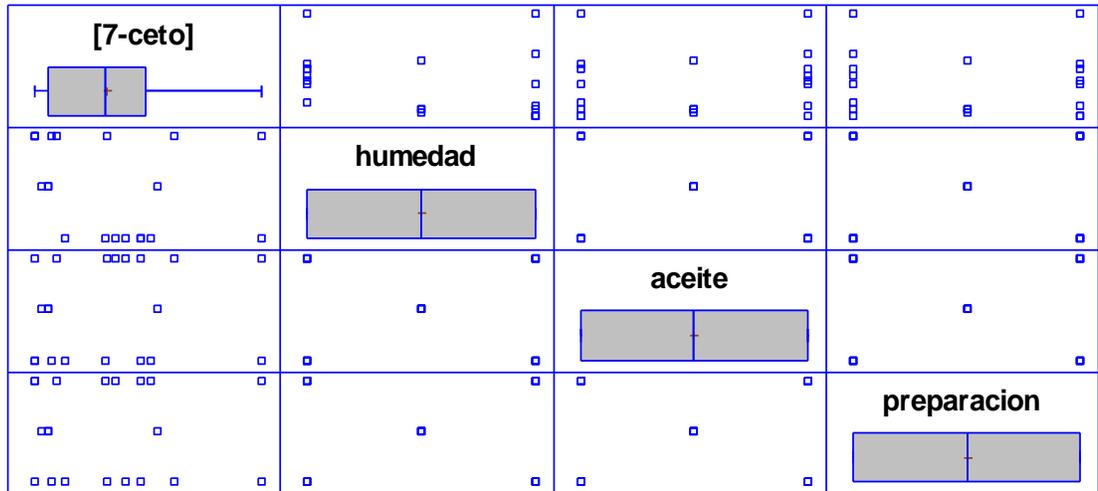
<sup>a</sup> Coeficiente de Correlación de Pearson

<sup>b</sup> Valor-p

Fuente: Esta Investigación

El gráfico 9 presenta los diagramas de dispersión de los parámetros medidos, en los que se observa que no existe linealidad entre los pares de variables mostrados, corroborando así los datos encontrados en la tabla anterior.

Grafico 9: Diagrama de dispersión de la matriz de correlación para factores y 7-Cetocolesterol



Fuente: Esta Investigación

## CONCLUSIONES

Se identificó 25-Hidroxicolesterol en muestras de costilla cruda y preparada mediante fritura directa en grasa de cerdo, pero a concentraciones muy bajas. El 6-Cetocolesterol no fue identificado en ninguno de los ensayos lo cual concuerda con la bibliografía, pues pocas veces se reporta.

El 7-Cetocolesterol fue identificado en casi todos los ensayos observando que la preparación mediante fritura directa con insumos cuyos contenidos de colesterol y lípidos totales son altos como son grasa de cerdo pura y carne costilla, respectivamente.

Los contenidos de colesterol, lípidos y agua de la carne de cerdo pura fueron similares a los reportados en la literatura; además los análisis estadísticos en estos parámetros bromatológicos demostraron que existe una correlación negativa entre contenidos de agua de la carne de cerdo y la concentración de 7-cetocolesterol con un coeficiente de Pearson de -0,6633.

Las razones de las diferencias en las concentraciones de óxidos de colesterol están relacionadas con el proceso de calentamiento o fritura y el grado de insaturación de ácidos grasos en los lípidos tanto del alimento como del aceite o grasa usada para ello.

La formación de óxidos de colesterol está asociada en gran medida al uso de piezas de carne de cerdo ricas en colesterol, ya que la exposición a fritura y según su preparación disminuye la concentración de colesterol por formación de COPs. Por otra parte, el uso de piezas de carne bajas en colesterol expuestas a frituras directas en grasas animales, también incrementan la concentración de COPs en menor proporción.

## RECOMENDACIONES

Se recomienda tener como base esta investigación y continuar con la misma con el fin de establecer otros factores determinantes en la formación de óxidos de colesterol en la preparación de frito pastuso ya que en el proceso de estandarización de recetas tradicionales pueden ser múltiples los factores condicionantes en la oxidación del colesterol.

Determinar la formación de óxidos de colesterol en otros alimentos típicos de la región que son de gran consumo por la población, con el fin de dar a conocer la influencia de la preparación tradicional en diferentes matrices.

Fortalecer vínculos entre Universidad de Nariño y las empresas públicas y privadas, con el propósito de continuar investigaciones en diferentes matrices de alimentos preparados con recetas tradicionales, para fortalecer programas orientados a disminuir factores de riesgo de enfermedades crónicas como las cardiovasculares que son la principal causa de muerte en la ciudad de San Juan de Pasto.

Implementar un programa de nutrición para aplicar esta información en la preparación de alimentos típicos.

Correlacionar la formación de los COPs con enfermedades crónicas con son las cardiovasculares y el cáncer gástrico

## BIBLIOGRAFIA

Addis, P.B., Warner, G.J. (1991). The potential health aspects of lipid oxidation products in food. En: Free radicals and food additives. Auroma, O., Halliwell, B. Eds. Taylor & Francis Ltd London, p 77-119.

Alasnier, C. Remington, H. Gandemer, G. meta science. (1996). 43. 213-224 p

An. R. Acad. Nac. Farm., Óxidos de colesterol en alimentos cocinados con presencia habitual en nuestra dieta (2007), 73 (4): 1159-1174

Ansari, G.A., Walker, R.D., Smart, V.B., Smith, L.L. Further investigations of mutagenic cholesterol oxide preparations. Food Chem Toxicol (1982); 20: 35-41.

Astiasarán, I; Ansorena, D; Echarte, M; Conchillo, A; Menéndez M. Óxidos de colesterol en alimentos cocinados con presencia habitual en nuestra dieta. Departamento de ciencias de la alimentación, fisiología y Toxicología. Facultad de farmacia. Universidad de Navarra. Irunlarrea s.n., pamplona. (2007)

Bodwell C. Anderson B. Nutritional composition and value of meat products. En: Muscle as Food,. Ed. Bechtel P. J. Academic Press. Orlando. (2012). pp. 321-360.

Bohinski. Bioquímica. (5ª ed). Ed. Adisson Wesley Iberoamericana. Delawere, USA. 1991. 739 p.

Boissonneault, G.A., Heiniger, H. 25-hydroxycholesterol-induced elevation in Ca uptake: correlation with depressed DNA synthesis, J Cell Physiol (1994); 120: 151-156.

Boissonneault, G.A., Heiniger, H. 25-hydroxycholesterol-induced elevation in <sup>45</sup>Ca uptake- permeability changes in P815 cells. J Cell Physiol (1995); 125: 471-475.

Browing, M.A.; Huffirian, D.L.; Egbert, W.R.; Jungst, S.B. Journal of Food.1990, 55, 9-14.

Carreño, M. García, C. Astiarán, I. Ansorena, D. Validation of a Gas Chromatography-Mass Method for the Analysis Sterol Oxidation Products in Serum, Journal of Chromatography B, 864 (2008) 61-68.

Cecil B. Johnson, Isolation of cholesterol oxidation products from animal fat using aminopropyl solid-phase extraction, Journal of Chromatography A, 736 (1996) 205-210.

Chien J.T., Wang H.C., Chen B.H. Kinetic model of the cholesterol oxidation during heating. *J. Agr. Food* (1998). *Chem.* 46: 2572-2577.

Daneshfar, A. Khezeli, T. Lotfi, H. Determination of cholesterol in food sample using dispersive liquid-liquid microextraction followed by HPLC. *Journal of Chromatography B.* 877. (2009) p 456-460.

Echarte, M., Zulet, A., and Astiasaran, I. Oxidation Process Affecting Fatty Acids and Cholesterol in Fried and Roasted Salmon. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2001). 49:5662-5667

Egan, H., Kirk, R., & Sawyer, R., "Análisis Químico de Alimentos de Pearson", 4ta edición, Compañía Editorial Continental, S.A. de C.V., México, (1991), p. 13-17, 19-39.

Fernandez, C.; Gallego, L.; López, A. XXI Jornadas Científicas de la SEOC. (1996), Logroño (España). 138 p.

Gabriela Carvajal S. Valor nutricional de la carne de Res, Cerdo y pollo. Corporación de fomento ganadero San José – costa rica. (2001). 25 p.

García-Cruset, S.; Carpenter, K.L.; Guardiola, F.; Stein, B.K. Y Mitchinson, M.J. Oxysterols profiles of normal human arteries, fatty streaks and advanced lesions. *Free Radical Res.* (2001) 53(1): 31-41.

García-Cruset, S.; Carpenter, K.L.; Guardiola, F.; Stein, B.K. Y Mitchinson, M.J. Oxysterols profiles of normal human arteries, fatty streaks and advanced lesions. *Free Radical Res.* (2001). 53(1): 31-41.

GIL M. Bañón S., Laencina J., Garrido M. Oxidación del colesterol en carne y derivados: factores que determina su formación. Área de Tecnología de Alimentos. Universidad de Murcia. Facultad de Veterinaria. Campus Universitario. AN. VET. (2004). 20: 21-34.

Horwitz, W.. Official methods of analysis of AOAC 985.29 international, 18th edition, AOAC International, Maryland, USA .(2005)., p236

Hwang, K. T. and Maeker, G. Quantitation of cholesterol oxidation products in unirradiated and irradiated meats. *Journal of American Oil Chemists Society.* (1993) 70: 371-375.

Instituto colombiano de bienestar familiar. Tabla de composición de alimentos. (2005). 234 p

Kowale, B. Rao, V. Babu, N. Sharma, N. Meat Sci. (1996), 43., p 195

Kritchevsky, D. Cholesterol vehicle in experimental atherosclerosis. Arch Pathol Lab Med (1988); 112: 1041-1044.

Kubow, S. Routes of formation and toxic consequences of lipid oxidation products in foods. Free Rad Biol Med (1992); 12: 63-81.

Kulig, M. J. and Smith, L. Sterol metabolism. XXV. Cholesterol oxidation by singlet molecular oxygen. Journal of Organic Chemistry. (2003). 38: p 3639-3642.

Kumari, A. Cholesterol oxidation products-analytical methods and levels in sweets containing heated butter oil. Tesis. Lantbruks university. (2009). 108 p.

Larkeson B, Dutta PC & Hansson I. Effects of frying and storage on cholesterol oxidation in minced meat products. J. Am. Oil Chem. (2000). Soc. 77, 675-680.

Lozada, J. Determinación de óxidos de colesterol en muestras de alimentos mediante cromatografía de gases. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de ciencias químicas. Departamento de química analítica. Madrid, España. (2012)

Lozada-Castro J. Gil-Díaz M. Santos-Delgado M. Rubio-Barroso S. Polo-Díez L. (2011). Effect of electron-beam irradiation on cholesterol oxide formation in different ready-to-eat-foods. Innovative food science and emerging technologies. V. 12., p 519-525

Maerker, G. and Jones, K. C. A-ring oxidation products from  $\gamma$ -irradiation of cholesterol in liposomes. Journal of American Oil Chemists Society. (1993). 70: 451-455.

Manual de cromatografía. [citado en octubre 10 de 2013] disponible en internet: [http://ocw.uv.es/ocw-formacio-permanent/2011-1-35\\_Manual.pdf](http://ocw.uv.es/ocw-formacio-permanent/2011-1-35_Manual.pdf)

Maraschiello C., García Regueiro J.A., Esteve E. La oxidación del colesterol y su influencia en la calidad de la carne y productos derivados. Eurocarne (1997). 53: 67-74.

Miller, J. Estadística quimiometría para química analítica. Madrid. Prentice may. (2002)., p 91

- Morel, D., Yi Lin, C. Cellular biochemistry of oxysterol derived from the diet or oxidation in vivo. *NutBiochem* (1996); 7: 495-506.
- Mubbashed, S. Hayat, I. Dilnawaz, S. Estimación de sterols in edible fats and oils. *Pakistan Journal of Nutrition*. (2003). 2 (3): 178-181.
- Nam K.C., Du M., Jo C., Ahn D.U. Cholesterol oxidation products in irradiated raw meat with different packaging and storage time. *Meat Sci.* (2001) 58: 431-435
- Nawar W. *Lipids: en Food Chemistry*. Ed Fenema O.R. Marcel Dekker. New York. (1985). 185 p
- Nielsen, J. H., Olsen, C. E., Skibsted, L.H. (1996). Cholesterol oxides II. Measurement of the 5,6-epoxides during cholesterol oxidation in aqueous dispersion. *Food Chemistry*. 56:33-37.
- Nielsen J. Olsen C. Skibsted L. (1996). Cholesterol oxidation in a heterogeneous system initiated by water-soluble radicals. *Food chemistry* . vol. 56. N° 1. p 33-37
- Nishio, E., Watanabe, Y. (1996). Oxysterols induced apoptosis in cultured smooth muscle cells through CPP32 protease activation and bcl-2 protein down-regulation. *Biochim Biophys Res Commun* 1996; 226: 928-934.
- Nourooz-Zadeh J., Appelquist L.A., Colesterol oxides in Swedish foods and food ingredients: Fresh eggs and dehydrated egg products. *J. Food Sci.* 52 (1987), 57-67.
- Paniangvait P., King A.J., Jones A.D., German B.G., Cholesterol oxides in foods of animal origin. *J. Food Sci.* 606, (1995), 1159-1174
- Pearson. D; *Técnicas de laboratorio para el análisis de Alimentos*; Acribia, S.A Zaragoza (España) 1993.
- Pie J., Spahis k., Seillan C. Evaluation of oxidative degradation of cholesterol in food and food ingredients: identification and cuantificación of cholesterol oxides. *J agric. Food chem.* 1990. 38. 973-979
- Quattrocchi, O. Andrizzi, S. Laba, R. *Introducción a la HPLC, aplicación y práctica, análisis cualitativo*. Editorial farro. S.A. Buenos Aires. 1992.407 p.
- Rosero A. *Caracterización de los componentes mayoritarios presentes en el aceite esencial de hojas y tallo de la planta salvielungo del galeras "Lepechinia*

Vulcanicola” por medio de CG-EM. Tesis. Universidad de Nariño. Facultad de ciencias exactas y naturales. Departamento de química. Pasto. Colombia. 2013

Sevanian, A. Y Peterson, A.R. The cytotoxic and mutagenic properties of cholesterol oxidation products. *Food Chem Toxicol.* 2000. 24(10-11): 1103-1110.

Shu-Mei Lsi, Ian Gray, and Matthew E. Zabik, Evaluation of Extraction and Gas Chromatography for Determination of Cholesterol Oxidation Products in Spray-Dried

Skoog, D. Holler, J. Nietman, T. principios de análisis instrumental. Madrid. Mc Graw-Hill, 1992. 1128 p.

Terrasa A. (2012) Alternativas tecnológicas aplicables al desarrollo y conservación de productos cárnicos cocidos (pates) durante el almacenamiento refrigerado. (tesis de matesria). Universidad de la plata. Facultad de ciencias veterinarias. Argentina., p 189

Valenzuela A. Sanhueza J. Nieto S. Digestión, absorción y transporte de los ácidos grasos: ¿Cuánto es utilizable desde el punto de vista nutricional? *Rev Chil Nutri* 2001; 28: 396-405.

Valenzuela A., Sanhueza J., Nieto S. Óxidos de colesterol (oxisteroles): factores que condicionan su formación, efectos biológicos, y su presencia en alimentos. *Rev Chil Nutr.* 2002. Vol. 29, N°2.

Velarde, E. Gonzales, A. Colesterol y óxidos de colesterol en carne de pollo. *Revista de química.* Diciembre de 2006. 11-20 p

Whole Egg, J. *Agric. Food Chem., American Chemical Society* 43 (1995) 1122-1126.

Zhang W.B., Addis P.B., Krick T.P., Quantification of 5 $\alpha$ -cholestane-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol and other cholesterol oxidation products in fast food French fried potatoes. *J. Food Sci.* 56, (1991), 716-718.

Zhou, Q.; Wasowicz, E.; Handler, B.; Fleisher, L. Y Kummerov, F.A. An excess concentration of oxysterols in the plasma is cytotoxic to cultured endothelial cells. *Atherosclerosis* (2000) 149: 191-197.

## ANEXOS

### Anexo A: Cálculo de Porcentajes de Recuperación

Porcentaje de recuperación para 25-Hidroxicolesterol:

$$\text{ÁreaE} - \text{ÁreaS} = \text{Área del analito}$$

Ecuación 5

$$165433 - 80182 = 85251$$

Despejando X de la ecuación  $Y = 20320x + 2408$  y reemplazando el área del analito tenemos la concentración de este compuesto

$$X = 4,07 \text{ mg/L}$$

Al multiplicar por el volumen de dilución (250 $\mu$ L) obtenemos los mg de 25-Hidroxicolesterol.

$$4,07 \text{ mg/L} \times 0,000250 \text{ L} = 0,001019 \text{ mg (experimental)}$$

El volumen en litros de la mezcla estándar agregada es 0,00005 L con este valor y el de la concentración de la mezcla tenemos el valor teórico en mg agregado.

$$0,00005 \text{ L} \times 20 \text{ mg/L} = 0,001 \text{ mg (teórico)}$$

Con el valor experimental y el teórico se calcula el porcentaje de recuperación del analito.

$$\frac{0,001019 \text{ mg}}{0,001 \text{ mg}} \times 100\% = 101,9\% \text{ (25-OH)}$$

Los porcentajes de recuperación para 7-Cetocolesterol y 6-Cetocolesterol se calcularon utilizando el mismo procedimiento.

## Anexo B: Cuantificación de Colesterol en materias primas y frito pastuso

La cuantificación de colesterol tanto para materias primas como para muestras de frito pastuso se realizó a partir de la curva de calibración; por ejemplo para la muestra de manteca de cerdo.

Ecuación de la recta para el colesterol:  $Y = 8313,34 X + 8614,4$

$$Y = mX + b$$

$X = (Y - b) / m$  donde  $x$  es el área del pico de cada una de las muestras.

Remplazando: Si  $Y = 2732551 \text{ mV}$

$$X = (2732551 - 8614) / 8313,34$$

$X = 327,66 \text{ mg/L} \times 0,005 \text{ L} = 1,31 \text{ mg} / 6 \text{ g muestra} = 0,2730 \text{ mg/g}$  de Colesterol en manteca de cerdo

Donde 0,005L es el factor de dilución de la muestra antes de ser inyectada y 6 g es la cantidad de muestra total utilizada.

Las tablas 30 y 31 presentan los resultados de la cuantificación de colesterol tanto para materias primas como para frito pastuso.

Tabla 30: Parámetros estadísticos en la cuantificación de colesterol en insumos.

muestra	area1	area2	[ppm]1	[ppm]2	Media <sup>a</sup>	SD	RSD	vol-dil <sup>b</sup>	Mg	mg/g <sup>c</sup>
Lomo	853342	842941	102,86	100,36	101,61	1,76	1,74	0,005	0,508	0,0847
Pierna	2197500	2150962	268,8	257,7	263,29	7,8	2,96	0,005	1,316	0,2194
costilla	3541658	3478436	432,58	417,38	424,98	10,74	2,53	0,005	2,125	0,3542
Grasa	2732551	2674952	334,47	320,73	327,6	9,72	2,97	0,005	1,638	0,2730
V. nuevo	1893375	1847691	232,18	221,22	226,7	7,75	3,42	0,005	1,134	0,1889
V. reutili	1170766	1132911	144,36	135,24	139,8	6,75	4,61	0,005	0,699	0,1165

<sup>a</sup> Valor medio de colesterol en ppm

<sup>b</sup> Volumen de dilución

<sup>c</sup> mg de colesterol en 6 g de muestra

Tabla 31: Parámetros estadísticos en la cuantificación de colesterol en frito pastuso

MUESTRA	area1	area2	[ppm]1	[ppm]2	Media <sup>a</sup>	SD	RSD	vol-dil <sup>b</sup>	Mg	mg/g <sup>c</sup>
A1	9772632	9390004	1174,5	1129,5	1152	31,8	2,76	0,0050	5,76	0,96
B1	625879	579942	74,25	69,75	72	3,2	4,42	0,0050	0,36	0,06
C1	4292478	4029562	515,3	484,7	500	21,6	4,33	0,0100	5,00	0,83
D1	2683847	2512377	321,8	302,2	312	13,9	4,44	0,0050	1,56	0,26
E1	3454493	3221505	414,5	387,5	401	19,1	4,76	0,0100	4,01	0,67
F1	2573113	2400314	308,48	288,72	298,6	14,0	4,68	0,0070	2,09	0,35
G1	4680711	4572423	562	550	556	8,5	1,53	0,0110	6,12	1,02
H1	4902428	4749747	588,67	571,33	580	12,3	2,11	0,0060	3,48	0,58
I1	3757930	3633016	451	437	444	9,9	2,23	0,0050	2,22	0,37
J1	3312834	3130391	397,46	376,54	387	14,8	3,82	0,0110	4,26	0,71
A2	4942581	5141887	593,5	618,5	606	17,7	2,92	0,0100	6,06	1,01
B2	4242598	4046189	509,3	486,7	498	16,0	3,21	0,0100	4,98	0,83
C2	4397392	4157421	527,92	500,08	514	19,7	3,83	0,0100	5,14	0,86
D2	6207456	5872214	745,65	706,35	726	27,8	3,83	0,0100	7,26	1,21
E2	3262705	3163894	391,43	380,57	386	7,7	1,99	0,0100	3,86	0,64
F2	6093979	5686411	732	684	708	33,9	4,79	0,0050	3,54	0,59
G2	6084003	5679760	730,8	683,2	707	33,7	4,76	0,0060	4,24	0,71
H2	4778725	4540916	573,79	546,21	560	19,5	3,48	0,0015	0,84	0,14
I2	8261267	7709046	992,7	927,3	960	46,2	4,82	0,0020	1,92	0,32
J2	4456999	4313961	535,09	518,91	527	11,4	2,17	0,0100	5,27	0,88

<sup>a</sup> Valor medio de colesterol en ppm

<sup>b</sup> Volumen de dilución

<sup>c</sup> mg de colesterol en 6 g de muestra

## ANEXO C: Cuantificación de COPs en Materias Primas y Frito Pastuso

A partir de las ecuaciones de la curva de calibración de cada patrón se procede a realizar la cuantificación de los COPs en cada una de las muestras tanto en materias primas como de frito pastuso.

$$25\text{-Hidroxicolesterol: } Y = 20320X + 2408,5$$

$$7\text{-Cetocolesterol: } Y = 28563X - 2741,5$$

$Y = mX + b$  despejando X obtenemos:

$$X = \frac{b - Y}{m}$$

*Donde x es el área del pico de cada una de las muestras.*

Remplazando tenemos por ejemplo para 25-OH en muestra de carne costilla cruda.

$$\text{Si } Y = 34511 \text{ mV}$$

$$X = \frac{34511 - 2408,5}{20320}$$

$$X = 1,58 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \times 0,000250 \text{ L} = 0,000395 \text{ mg de 25-OH}$$

Donde 0,000250L es el factor de dilución de la muestra antes de ser inyectada.

$$0,000395 \text{ mg} = 0,395 \mu\text{g}/6\text{g} = 0,0658 \mu\text{g/g}$$

Donde 6g es el peso total de la muestra utilizada para el análisis.

El mismo procedimiento se emplea para la cuantificación de 7-Ceto utilizando la ecuación respectiva.

Tabla 32: Cuantificación de COPs en materias primas

Muestra	Compuesto	area1	area2	[ppm]1	[ppm]2	Media <sup>a</sup>	SD	RSD	Vol-Dil <sup>b</sup>	Mg	µg	µg/g <sup>c</sup>
Lomo	25-Hidroxicolesterol	ND	ND	ND	ND	Nd	ND	ND	0,000250 L	ND	ND	ND
Pierna		ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,000250 L	ND	ND	ND
Costilla		35042,42	33985,78	1,606	1,554	1,58	0,04	2,33	0,000250 L	0,0003948	0,3948	0,0658
Grasa		4688,404	4598,996	0,1122	0,1078	0,11	0,0031	2,83	0,000250 L	0,0000283	0,0283	0,0047
v.nuevo		ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
v.reutilizado		20605,06	19568,74	0,8955	0,8445	0,87	0,0361	4,15	0,000250 L	0,000217	0,217	0,0362
Lomo	7-Cetocolesterol	56355,847	54870,571	2,069	2,017	2,043	0,04	1,80	0,000250 L	0,0005106	0,5106	0,0851
Pierna		ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,000250 L	ND	ND	ND
Costilla		147357,57	144215,64	5,255	5,145	5,2	0,08	1,50	0,000250 L	0,0013002	1,3002	0,2167
Grasa		98400,583	94915,897	3,541	3,419	3,48	0,09	2,48	0,000250 L	0,000871	0,871	0,1452
v.nuevo		ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
v.reutilizado		6469,1394	6329,1807	0,32245	0,31755	0,32	0,00	1,08	0,000250 L	0,00008	0,08	0,0133

<sup>a</sup> Valor medio de colesterol en ppm

<sup>b</sup> Volumen de dilución

<sup>c</sup> µg de COPs en 6 g de muestra

Tabla 33: Parámetros estadísticos en la cuantificación de COPs en frito pastuso

Muestra	area1	area2	[ppm]1	[ppm]2	Media <sup>a</sup>	SD	RSD	vol-dil <sup>b</sup>	mg	µg	µg/g <sup>c</sup>
A1	201912,4	197056,6	7,165	6,995	7,08	0,12	1,7	0,00025	0,00177	1,77	0,296
B1	85118,2	80319,7	3,076	2,908	2,99	0,12	4,0	0,00025	0,000748	0,748	0,125
C1	256981,8	251669,1	9,09	8,91	9,00	0,13	1,5	0,00025	0,00225	2,25	0,376
D1	18309,4	17109,7	0,737	0,695	0,72	0,03	4,1	0,00025	0,000179	0,179	0,029
E1	198199,2	191629,7	7,035	6,805	6,92	0,16	2,4	0,00025	0,00173	1,73	0,289
F1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,00025	ND	ND	ND
G1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,00025	ND	ND	ND
H1	35875,6	33590,6	1,35	1,27	1,31	0,06	4,3	0,00025	0,000328	0,328	0,06
I1	34990,2	33562,0	1,32	1,27	1,30	0,04	2,7	0,00025	0,000324	0,324	0,054
J1	220592,6	227733,3	7,82	8,07	7,94	0,18	2,2	0,00025	0,001986	0,1986	0,331
A2	400710,8	384429,9	14,125	13,555	13,84	0,40	2,9	0,00025	0,00346	3,46	0,578
B2	305167,6	292599,9	10,78	10,34	10,56	0,31	2,9	0,00025	0,00264	2,64	0,44
C2	799307,5	758176,8	28,08	26,64	27,36	1,02	3,7	0,00025	0,00684	5,64	0,94
D2	409708,2	384572,7	14,44	13,56	14	0,62	4,4	0,00025	0,0035	3,5	0,058
E2	334873,1	320020,4	11,82	11,3	11,56	0,37	3,2	0,00025	0,00289	2,89	0,482
F2	470833,0	444555,0	16,58	15,66	16,12	0,65	4,0	0,00025	0,00403	0,402	0,067
G2	58668,9	57640,6	2,15	2,114	2,132	0,03	1,2	0,00025	0,000533	0,533	0,089
H2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,00025	ND	ND	ND
I2	351868,1	339586,0	12,415	11,985	12,2	0,30	2,5	0,00025	0,00305	3,05	0,509
J2	302025,7	291171,7	10,67	10,29	10,48	0,27	2,6	0,00025	0,00262	2,62	0,437
25-Hidroxicolesterol											
C1	34361,8	33733,4	1,299	1,277	1,288	0,02	1,2	0,00025	0,000322	0,0322	0,005
C2	31448,4	30248,7	1,197	1,155	1,176	0,03	2,5	0,00025	0,000294	0,294	0,049

<sup>a</sup> Valor medio de colesterol en ppm

<sup>b</sup> Volumen de dilución

<sup>c</sup> µg de 7-Cetocolesterol en 6 g de muestra

ANEXO D: Tablas ANOVA por factor del diseño experimental (DCA)

Tabla 34: ANOVA para 7-Cetocolesterol por preparación

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	0,125974	2	0,0629868	<u>0,98</u>	<u>0,3970</u>
Intra grupos	1,09723	17	0,0645432		
Total (Corr.)	1,22321	19			

Tabla 35: ANOVA para 7-Cetocolesterol por aceite

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	0,318562	4	0,0796406	<u>1,32</u>	<u>0,3074</u>
Intra grupos	0,904646	15	0,0603097		
Total (Corr.)	1,22321	19			

Tabla 36: ANOVA para 7-Cetocolesterol por humedad

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	0,384908	2	0,192454	<u>3,90</u>	<u>0,0403</u>
Intra grupos	0,838301	17	0,0493118		
Total (Corr.)	1,22321	19			

ANEXO E: Artículo científico

**Grasas y aceites**

Sevilla, 6 de Noviembre 2013

Estimado Dr. Álvarez Castillo:

Su manuscrito titulado: "Formación de óxidos de colesterol en el proceso de preparación de frito pastuso mediante HPLC" (nuestra referencia 110713), fue recibido en la oficina editorial de *Grasas y Aceites* el 6/11/13.

El mismo será estudiado inmediatamente por el Consejo de Redacción y será enviado a evaluadores con acreditada experiencia para su evaluación.

Usted será informado del resultado de la evaluación cuando el proceso haya sido completado. Por favor, use nuestro correo electrónico ([grasasyaceites@ig.csic.es](mailto:grasasyaceites@ig.csic.es)) para cualquier consulta relacionada con este manuscrito o con cualquier información que usted necesite.

El envío de un manuscrito a *Grasas y Aceites* implica que el trabajo descrito no ha sido publicado con anterioridad ni está siendo considerado para su publicación por cualquier medio, incluyendo revistas electrónicas y bases de datos de naturaleza pública. Este manuscrito está siendo evaluado considerando que ha sido enviado de forma exclusiva. Si esto no es así, por favor comuníquelo a la mayor brevedad.

Gracias por considerar *Grasas y Aceites* para la publicación de su trabajo.

Atentamente,

Dra. M.Carmen Pérez-Camino  
Directora, Grasas y Aceites  
Instituto de la Grasa, CSIC  
Avenida Padre García Tejero 4  
41012-Sevilla. España  
Telf.: +34 954 611 550  
Fax: +34 954 616 790

e-mail: [grasasyaceites@ig.csic.es](mailto:grasasyaceites@ig.csic.es)

## FORMACIÓN DE ÓXIDOS DE COLESTEROL EN EL PROCESO DE PREPARACIÓN DE FRITO PASTUSO MEDIANTE HPLC.

Lozada-Castro, J.J.; Álvarez-Castillo, W.A.; Montezuma-Riascos, L.V.

Se determinó la formación de 5-colesten-3 $\beta$ ,25-diol(25-hidroxicolesterol), 3 $\beta$ -hidroxi-5 $\alpha$ -colesten-6-ona (6-Cetocolesterol) y 3 $\beta$ -hidroxi-5 $\alpha$ -colesten-7-ona(7-Cetocolesterol), en el proceso de formación de frito pastuso (alimento típico de Nariño, Colombia), mediante SPE y HPLC-UV en fase reversa. Se incluyeron los factores: receta de preparación, tipo de grasa o aceite utilizado y tipo de carne de cerdo, por medio de diseño experimental DCA y tres niveles en cada caso, se realizaron 10 ensayos totalmente aleatorizados por duplicado y para verificar la reproducibilidad de los resultados dos bloques, aplicándose a los diferentes insumos para la preparación y en el alimento listo para el consumo. El 7-Cetocolesterol estuvo presente en la mayoría de las muestras; con los niveles más altos en las muestras de los experimentos donde se utilizó: carne de costilla, grasa de cerdo y la receta de fritura directa de la carne, los niveles más bajos se encontraron para los experimentos donde se utilizó lomo y pierna, aceite reutilizado y preparaciones en las que se sometió la carne a cocción en agua y posterior fritura respectivamente. Las desviaciones estándar relativa fueron inferiores al 4,76% y en todos los casos los resultados obtenidos fueron reproducibles.

Palabras clave: COPs, 7-Cetocolesterol, SPE, Frito pastuso

### INTRODUCCIÓN

El colesterol (5-colestan-3,2 $\beta$ -ol) es el principal esteroide presente en los tejidos animal, cumpliendo numerosas funciones en el organismo humano: participa en la formación de hormonas sexuales, ácidos biliares; los cuales juegan un rol importante en la digestión y absorción de las grasas, así como en la producción de hormonas que regulan el balance de sodio y potasio en el cuerpo humano, también participa en la síntesis de la vitamina D.<sup>[1]</sup>

Frecuentemente en los procesos de conservación y manipulación los alimentos de origen animal se someten a procedimientos como: tratamiento térmico, exposición al ambiente, luz, radiación, iones metálicos o combinación de estos factores, los cuales pueden conducir a reacciones y cambios no deseados, tales como la pérdida del valor nutricional debido a la oxidación de lípidos incluyendo al colesterol<sup>[2-5]</sup>, el cual puede dar origen a más de 70 compuestos de oxidación denominados genéricamente COPs; compuestos que poseen estructuras semejantes al colesterol pero con algunos grupos funcionales como hidroxilos, cetona o epóxido en diferentes posiciones de la estructura original del colesterol<sup>[6]</sup>

Estudios in vivo e in vitro han demostrado que los COPs poseen una serie de efectos potencialmente aterogénicos, citotóxicos, mutagénicos y carcinogénicos, por ejemplo el  $\alpha$ -epoxicolesterol causa lesiones ateroscleróticas y tiene actividad

carcinógena, el 25-hidroxicolesterol y el colestanoetriol, presentan actividad citotóxica y angiotóxica<sup>[6,7,8,9]</sup>, Además estos compuestos pueden alterar las funciones de la membrana e inhibir la síntesis de colesterol.<sup>[10]</sup>

En este trabajo se determinó la formación de algunos COPs en el proceso de preparación de un alimento típico de Nariño Colombia (frito pastuso), el cual se somete a diferentes procesos de cocción, lo que permitirá establecer si existe relación alguna con enfermedades cardiovasculares; teniendo en cuenta que la principal causa de mortalidad de esta región son estas enfermedades crónicas.

## MATERIALES Y METODOS

### Equipos y Materiales

Se usó un sistema de cromatografía líquida de alta eficiencia HPLC Waters Breeze , equipado con bomba binaria Waters 1525 (USA), inyector Rheodyne 7525I, con loop de 20  $\mu$ L y detector de arreglo de diodos PDA Waters 2998. La adquisición de los datos se realizó con el programa Empower II de Waterscorporation. La separación de los COPs se realizó en una columna C8 (Hypersil Gold, ThermoScientific 150mm x4,6 mm) termostatzada a 30 °C.

Cartuchos de sílica gel de 500 mg y volumen de 3 mL para extracción en fase sólida (Restek, Bellefonte, USA). Filtros de nylon de 4 mm y 0,4  $\mu$ m (NationalScientific, USA).

### REACTIVOS

#### Estándares

Colesterol al 98% (Merck, Alemania), 7-Cetocolesterol, 6-cetocolesterol y 25-hidroxicolesterol (Sigma-Aldrich. USA, pureza >98%)

#### Disolventes y otros reactivos

Acetonitrilo, Cloroformo, n-Hexano y Acetona (Solventes grado HPLC, Burdick-Jackson, USA). 2-propanol grado HPLC (Fisher scientific, USA), Sulfato de sodio anhidro, Panreac, PA-ACS-ISO (España)

#### Muestras de Alimentos

Las muestras de carne y grasa de cerdo se adquirieron en Porkilandia, punto de venta reconocido por los habitantes de la ciudad de Pasto Colombia, el aceite de palma de marca Sabrosón, fue adquirido en almacenes de cadena de la Ciudad.

## PROCEDIMIENTOS

Parámetros característicos de la muestra e insumos relacionados con los COPs.

Se analizaron los COPs en insumos: carne cruda, carne frita, muestras de grasa, aceite nuevo y aceite utilizado, según el diseño experimental. Los parámetros estudiados fueron Humedad, lípidos totales y colesterol, los análisis de humedad y lípidos totales se realizaron en los laboratorios especializados de la Universidad de Nariño Pasto Colombia. La determinación del contenido de colesterol se realizó por HPLC siguiendo la metodología de Daneshfar, Khezeli y Lotfi, (2009).<sup>[11]</sup>

### Frito Pastuso

En la siguiente tabla se presenta el diseño experimental con dos experimentos centrales el cual incluye los factores: tipo de preparación, tipo de aceite usado, humedad de la carne y el número de muestras realizándose en dos bloques para evaluar la reproducibilidad experimental.

Tabla 1: Diseño experimental

Bloque	Preparación	Aceite	Humedad	Bloque	Preparación	Aceite	Humedad
I	-1	1	1	II	-1	1	1
	-1	-1	-1		-1	-1	-1
	-1	1	-1		-1	1	-1
	0	0	0		0	0	0
	1	-1	-1		1	-1	-1
	-1	-1	1		-1	-1	1
	1	1	1		1	1	1
	1	-1	1		1	-1	1
	0	0	0		0	0	0
	1	1	-1		1	1	1

Los factores y los niveles experimentales fueron:

Tabla 2: Clasificación de cada nivel del diseño experimental

Nivel	Preparación	Aceite	Humedad
1	Carne condimentada (adobada) un día antes, cocción por 20 min, después frita por 10 min.	Grasa de cerdo	Lomo
0	Carne condimentada minutos antes, cocción por 20 min, después frita por 10 min.	Vegetal reutilizado	Pierna
-1	Carne condimentada minutos antes y frita directamente por 30 min.	Vegetal nuevo	Costilla

## COPs Extracción y Limpieza

La extracción de la fase lipídica y la limpieza de las muestras, se realizó según la metodología descrita en la literatura de Lozada, Gil, Santos, Rubio, Polo, (2011).<sup>[12]</sup>

### Determinación de Colesterol por HPLC

Al residuo obtenido del extracto lipídico se eliminó el exceso de disolvente de los lavados, obteniendo un residuo que contenía el colesterol el cual se diluyó entre 5-8 mL de isopropanol. Se inyectaron 20 µL del extracto anterior en el sistema cromatográfico a través de un filtro con membrana de nylon situado entre el cuerpo y la aguja de la jeringa, y se midió a una longitud de onda de 205 nm.

### Determinación de COPs por HPLC

Los COPs se eluyeron del cartucho de sílica gel con 10 mL de acetona; posteriormente se evaporó la acetona con atmósfera de N<sub>2</sub>, el residuo obtenido se disolvió con 250 µL de ACN y se inyectó 20 µL en el sistema cromatográfico usando un filtro de teflón entre el cuerpo y la aguja de la jeringa, se midió a 205 y 238 nm respectivamente.

Los analitos fueron separados usando modo isocrático. Con una fase móvil compuesta de ACN:Agua, 90:10 y un flujo 1,5 mL/min. Se realizó la lectura simultáneamente a 205 y 238 nm con detector PDA. Los tiempos de retención y las áreas de los picos fueron usados para la identificación y cuantificación usando el método de calibración con estándar externo.

### Análisis Estadístico

Los diferentes contenidos de COPs en las muestras procesadas y no procesadas fueron evaluados mediante test ANOVA, análisis de varianza y gráficos de correlación, usando el programa statgraphics centurión XVI.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Parámetros característicos de la carne de cerdo: colesterol, humedad y lípidos.

Los contenidos de algunos parámetros bromatológicos buscan relacionar la formación de COPs en la preparación de frito pastuso. Colesterol, lípidos y humedad fueron analizados en cada muestra tanto de insumos como de producto final; todos los parámetros fueron medidos por duplicado obteniendo resultados reproducibles.

Tabla3: Contenido de humedad, lípidos y colesterol en insumos

MUESTRA	Agua, (%)		Lípidos, (%)		Colesterol, (mg/g)	
	Media <sup>a</sup>	RSD <sup>b</sup>	Media	RSD	Media	RSD
Lomo	66,4	4,9	12,3	4,02	0,0847	1,74
Pierna	74,2	4	3,16	4,92	0,2194	2,96
Costilla	71,8	2,56	6,88	2,47	0,3542	2,53
Manteca de Cerdo	-	-	-	-	0,2730	2,97
Vegetal Nuevo	-	-	-	-	0,1889	3,42
Vegetal Reutilizado	-	-	-	-	0,1165	4,61

<sup>a</sup> Valores medios

<sup>b</sup> Desviación estándar relativa, %, n=2

Los 10 ensayos aleatorizados descritos de A-J para los dos bloques, se resumen en la siguiente tabla, la descripción de cada uno se presenta en las tablas 1 y 2.

Tabla 4: Contenido de humedad, lípidos y colesterol en frito pastuso

Ensayo <sup>a</sup>	Agua <sup>b</sup> , (%)	RSD <sup>c</sup>	LIPIDOS, (%)	RSD	COLESTEROL, (mg/g)	RSD
A1	48,7	4,36	9,38	0,75	0,96	2,76
B1	50,5	3,36	11,2	4,42	0,31	4,44
C1	50,4	3,65	14,2	4,48	0,83	4,33
D1	59,7	3,32	6,21	4,62	0,26	4,44
E1	52,8	2,41	15,7	4,32	0,67	4,76
F1	43,3	4,57	11,5	3,79	0,35	4,68
G1	52,9	3,21	11,5	3,69	1,02	1,50
H1	54,5	3,37	10,8	4,03	0,58	2,10
I1	59,9	3,31	14,8	3,48	0,37	2,23
J1	48,9	2,60	18,5	3,44	0,71	3,82
A2	43,2	4,58	10,5	2,73	1,01	2,94
B2	36,6	4,64	27,4	2,48	0,83	3,20
C2	33,2	4,70	16,2	1,20	0,86	3,83
D2	41,5	4,77	20,5	2,07	0,21	3,74
E2	42,6	2,99	26,4	1,65	0,64	1,99
F2	47,8	4,14	6,0	4,78	0,59	4,79
G2	53,2	3,19	8,78	4,82	0,71	4,76
H2	52	4,35	8,79	4,84	0,14	3,48
I2	47,7	4,45	11,9	3,66	0,32	4,82
J2	47,8	2,07	20,7	2,10	0,88	2,17

<sup>a</sup> Ensayos etiquetados según diseño experimental para bloque 1 y 2

<sup>b</sup> Valores medios

<sup>c</sup> Desviación estándar relativa; %

El contenido de agua es un parámetro importante en la determinación de COPs ya que podría intervenir en el proceso de formación de óxidos de colesterol, tanto en

el proceso de preparación, como en el almacenado. Las muestras de carne de los bloques 1 y 2 poseen menos concentración de agua que las muestras crudas (tabla 4), ya que en el proceso de preparación se pierden tanto agua como otros compuestos propios de la carne, estos valores oscilan entre 33,2% – 59,9% respectivamente. Con respecto a los valores de colesterol en insumos se puede observar que la manteca de cerdo pura obtuvo la mayor cantidad de Colesterol (0,2730mg/g), lo cual es razonable debido a que este compuesto es propio de animales, mientras que en menor cantidad se encontró en aceite vegetal (0,1889 mg/g). Es interesante destacar los resultados obtenidos para la muestra de aceite reutilizado ya que al parecer presenta la menor concentración de colesterol (0,1165 mg/g). En muestras de frito pastuso los máximos valores fueron para lomo y costilla que corresponde a G, A y C, J, respectivamente y los valores más bajos fueron para las muestras D, I, que corresponde a pierna. Por otra parte, la fracción lipídica varió considerablemente entre las muestras de carne cruda y carne preparada ya que en el proceso de preparación se incrementó su concentración, obteniendo los valores más altos para las muestras B, C, E y J, que corresponden a costilla con valores de 11,2% - 36,2%; de igual forma los valores más bajos fueron obtenidos para las muestras de lomo y pierna respectivamente. El comportamiento de las muestras presentó variaciones en todos los casos posiblemente al efecto de los factores estudiados; sin embargo los análisis estadísticos indican que el valor-p de la razón F fueron mayores a 0,05; demostrando que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las muestras, con lo cual, parámetros como agua y colesterol deberían tratarse independientemente; por otra parte, este mismo valor para lípidos (valor-p < 0,05), indica que si existen diferencias estadísticamente significativas entre las muestras. Las desviaciones estándar relativas fueron inferiores a 4,84 % en todos los casos.

#### Validación del método

El método utilizado fue validado calculando: la linealidad, precisión, recuperación límites de detección y límites de cuantificación. Respecto a la linealidad se comprobó usando 7 puntos de calibrado en el rango de concentración de 0,1 – 100 ppm para COPs con coeficientes de correlación alrededor de 0,9997 – 0,9995; para cada nivel se realizaron dos replicas respectivamente. Para evaluar la precisión intra-día e inter-día se evaluaron a una concentración de 20 ppm de la mezcla de patrones durante 5 días consecutivos y 9 inyecciones por día encontrando desviaciones estándar relativas inferiores a 1,2 %. Los porcentajes de recuperación se evaluaron por triplicado en muestras de costilla de cerdo enriquecidas con la mezcla estándar de COPs de 50 ppm; estos valores estuvieron en el rango de 95% - 101,9%. La tabla 5 indica los límites de detección y cuantificación, recuperación y reproducibilidad del método utilizado.

Tabla 5: Características analíticas del método para determinación de COPs (\* n= 5, \*\* n= 9)

COPs	LD <sup>a</sup> μg/L	LQ <sup>b</sup> μg/L	Intra-día*		Inter-día**		Recuperación %
			X <sup>c</sup>	RSD <sup>d</sup>	X	RSD	
25-OH	1,06	2,91	1,056	0,29	0,93	0,78	101,9
6-CETO	22	61	0,971	0,96	1,21	1,18	95,0
7-CETO	7,8	23	1,221	0,25	1,12	0,93	98,24

<sup>a</sup>Límite de detección, μg/L

<sup>b</sup>Límite de cuantificación, μg/L

<sup>c</sup>valores medios, μg/g.

<sup>d</sup> desviación estándar relativa, %

25-OH: 25-Hidroxicolesterol

6-Ceto: 6-Cetocolesterol

7-Ceto: 7-Cetocolesterol

### Efecto del proceso de preparación de frito pastuso en la formación de COPs

Estudios realizados en este campo han demostrado que el uso de altas temperaturas, tiempos de preparación elevados y métodos de conservación inadecuados aceleran en gran medida las reacciones de oxidación del colesterol<sup>[6]</sup>. La influencia de los tres factores como preparación, grasa y humedad de la carne, están relacionados con la formación de COPs. El 7-Cetocolesterol estuvo presente en la mayoría de las muestras (figura 1a); el 25-Hidroxicolesterol fue detectado en grasa de cerdo, aceite vegetal reutilizado, costilla cruda y en el ensayo C del alimento preparado, pero a muy bajas concentraciones (figura 1b). 6-cetocolesterol no fue detectado. Las tablas 4 y 5 presentan las concentraciones y los valores de la desviación estándar en carne preparada y sin preparar.

Tabla 6: Contenidos de COPs y RSD en insumos.

MUESTRA	COMPUESTO	μg/g	RSD <sup>a</sup>	MUESTRA	COMPUESTO	μg/g	RSD
G. cerdo	25-OH	0,0046	2,8	Lomo	25-OH	ND	ND
	6-Ceto	ND	ND		6-Ceto	ND	ND
	7-Ceto	0,1450	2,5		7-Ceto	0,0851	1,8
v. nuevo	25-OH	ND	ND	Pierna	25-OH	ND	ND
	6-Ceto	ND	ND		6-Ceto	ND	ND
	7-Ceto	ND	ND		7-Ceto	ND	ND
v. reutilizado	25-OH	0,0363	4,1	Costilla	25-OH	0,0658	2,3
	6-Ceto	ND	ND		6-Ceto	ND	ND
	7-Ceto	0,0133	ND		7-Ceto	0,2167	1,5

<sup>a</sup>Desviación estándar relativa, % (n=2)

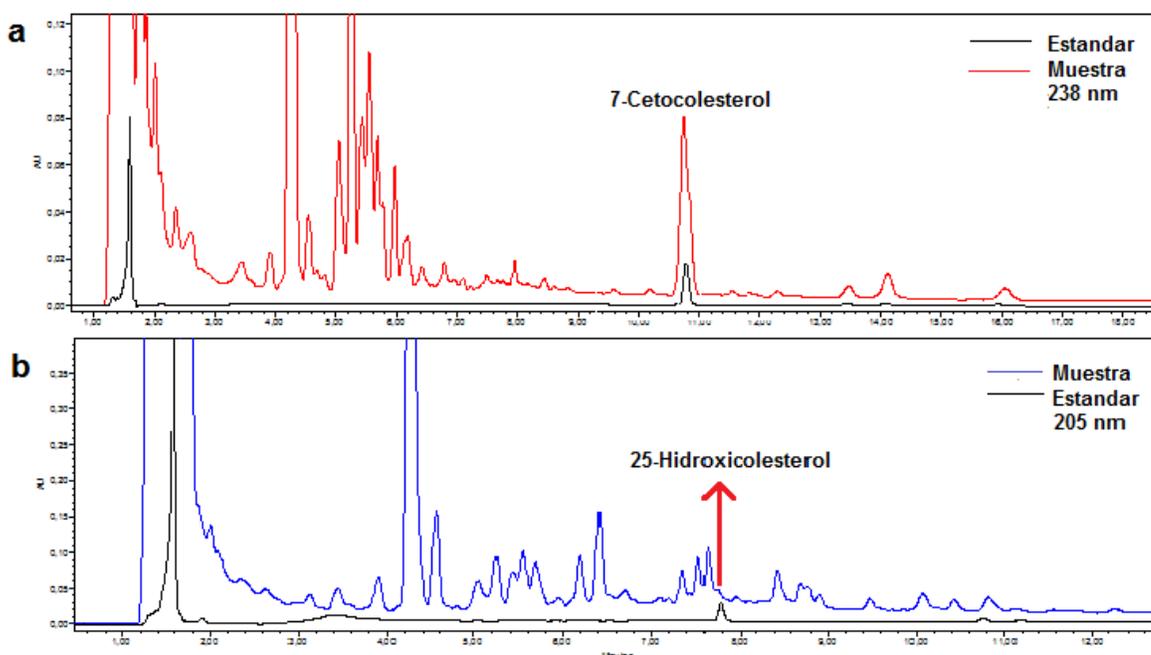


Figura 1: Cromatogramas de COPs obtenidos por HPLC-UV, usando columna C8 y acetonitrilo/agua, 90:10 y flujo 1,5 mL/min. a) solución estándar de 5 ppm y muestra preparada C2 a 238 nm para 7-Cetocolesterol. b) solución estándar de 5 ppm y muestra preparada a 205 nm para 25-Hidroxicolesterol.

## TIPO DE PREPARACIÓN

Las mayores concentraciones de 7-ceto fueron obtenidas para la fritura directa de la carne (nivel -1), que corresponde a las muestras C y A respectivamente, pero las menores concentraciones fueron para el tipo de preparación en la cual el adobo fue minutos antes de la cocción y posterior fritura (nivel 0), cuyas muestras fueron I, D y F, respectivamente, de igual forma, se obtuvieron similar comportamiento para las muestras G y H en la cual, también se utilizó cocción de la carne solo que el adobo fue un día antes de la preparación (nivel 1). Probablemente esta diferencia en las concentraciones se debe al efecto de factores como tiempo-temperatura ya que en la preparación sin cocción en agua, la carne estuvo expuesta por mayor tiempo a la temperatura de fritura que puede alcanzar valores hasta 175 °C; en la cocción y posterior fritura, la carne se expuso a temperatura de ebullición del agua y después a la fritura en aceite o grasa pero en menor tiempo.

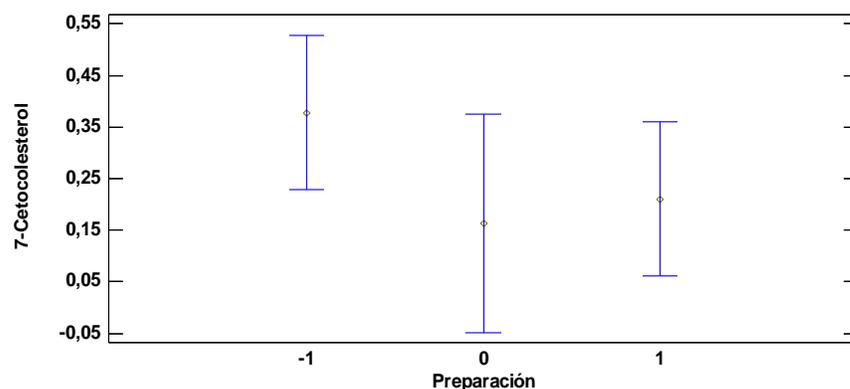


Figura 2: Influencia de la preparación en la formación de 7-Cetocolesterol

En cualquier caso, tanto las condiciones de tiempo-temperatura como la forma de preparación de alimentos, ejercen un efecto significativo sobre el grado de formación de COPs acelerando en gran medida las reacciones de oxidación lipídica disminuyendo en consecuencia la estabilidad oxidativa del colesterol de membrana.<sup>[6]</sup>

Tabla 7: Contenidos de COPs y RSD en frito pastuso

Muestra	Compuesto	Bloque 1		Bloque 2		Muestra	Compuesto	Bloque 1		Bloque 2	
		μg/g	RSD	μg/g	RSD			μg/g	RSD	μg/g	RSD
A	25-OH	ND	ND	ND	ND	F	25-OH	ND	ND	ND	ND
	6-Ceto	ND	ND	ND	ND		6-Ceto	ND	ND	ND	ND
	7-Ceto	0,296	1,7	0,578	2,9		7-Ceto	ND	ND	0,067	4
B	25-OH	ND	ND	ND	ND	G	25-OH	ND	ND	ND	ND
	6-Ceto	ND	ND	ND	ND		6-Ceto	ND	ND	ND	ND
	7-Ceto	0,125	4,0	0,440	2,9		7-Ceto	ND	ND	0,089	1,2
C	25-OH	0,005	1,2	0,049	2,5	H	25-OH	ND	ND	ND	ND
	6-Ceto	ND	ND	ND	ND		6-Ceto	ND	ND	ND	ND
	7-Ceto	0,376	1,5	0,940	3,7		7-Ceto	0,060	4,3	ND	ND
D	25-OH	ND	ND	ND	ND	I	25-OH	ND	ND	ND	ND
	6-Ceto	ND	ND	ND	ND		6-Ceto	ND	ND	ND	ND
	7-Ceto	0,029	4,1	0,058	4,4		7-Ceto	0,054	2,7	0,509	2,5
E	25-OH	ND	ND	ND	ND	J	25-OH	ND	ND	ND	ND
	6-Ceto	ND	ND	ND	ND		6-Ceto	ND	ND	ND	ND
	7-Ceto	0,289	2,4	0,482	3,2		7-Ceto	0,331	2,2	0,437	2,6

ND: No Detectado

## ACEITE O GRASA

En el análisis de COPs en insumos, se encontró que la grasa de cerdo y aceite reutilizado presentaron concentraciones apreciables de 7-Ceto pero solo se encontró una pequeña cantidad de 25-hidroxi en grasa de cerdo. Por otra parte, en las muestras de frito pastuso las concentraciones más bajas de 7-Ceto fueron para aceite reutilizado (nivel 0), las cuales fueron D e I respectivamente y cuyos niveles de colesterol fueron los más bajos, además, como es aceite reutilizado los hidroperóxidos lipídicos generados por autoxidación de ácidos grasos poliinsaturados y los radicales alcoxilo y peroxilo generados a partir de los mismos<sup>[13]</sup>, posiblemente afectaron tanto al colesterol como a otros lípidos presentes; de igual forma las muestras F, H, E y B que corresponden a aceite vegetal nuevo (nivel 1), presentaron valores bajos de concentración en comparación a las tratadas con grasa de cerdo (nivel-1), encontrando los máximos niveles de concentración del oxisterol y cuyas muestras fueron C, A y J respectivamente. Debido a que la grasa de cerdo posee ácidos grasos insaturados como el ácido linoleico, estos oxidan al colesterol más rápido que los aceites saturados durante el calentamiento<sup>[14]</sup>; Por otra parte, las capacidades de los aceites de cocina para inhibir la pérdida de colesterol se debe a que demasiado aceite sólo fluiría alrededor de la carne, en este caso, la degradación de colesterol sin duda disminuirá significativamente, debido a que el exceso de aceite podría formar una barrera física alrededor de la carne bloqueando el contacto del oxígeno y el colesterol<sup>[15]</sup>.

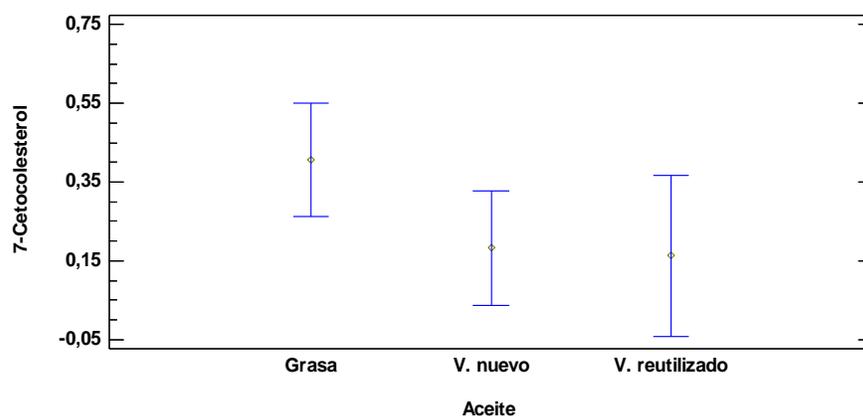


Figura 3: Influencia del tipo de aceite o grasa en la formación de 7-Cetocolesterol

Tipo de carne de cerdo.

En muestras de carne de cerdo cruda las concentraciones de COPs fueron mayores en costilla, encontrando tanto 7-Ceto como 25-Hidroxi siendo el ultimo el de menor concentración y en la única pieza de carne que fue encontrado. Aunque los niveles de COPS en carne fresca son mínimos o inexistentes, estos pueden presentarse a causa de exposición de los alimentos a condiciones de

almacenamiento o de conservación no adecuados, condiciones que se desconocen en este estudio,<sup>[3,16]</sup> por otra parte, Nam et al.<sup>[17]</sup>, en sus publicaciones reportan que han detectado cantidades apreciables de 7 $\alpha$ - y 7 $\beta$ -hidroxicolesterol y de 7-Cetocolesterol en hamburguesas frescas inmediatamente antes de ser almacenadas.

Con respecto a los ensayos en frito pastuso, las muestras con mayores concentraciones de 7-ceto fueron para costilla cuyos niveles de colesterol y lípidos fueron los más altos en los análisis de insumos y posiblemente fueron los desencadenantes del proceso oxidativo. De igual manera, los valores más bajos se encontraron para las piezas de lomo pero aun más bajos para las piezas de pierna respectivamente. Por consiguiente, es claro afirmar que la exposición a grasas animales, condiciones de tiempo-temperatura, método de cocinado aplicado, ejerza un efecto significativo sobre el grado de formación de oxisteroles. En este sentido, Nourooz-Zadeh y Appelqvist,<sup>[18]</sup> concluyeron que, en corteza de cerdo fresca no se detectan cantidades cuantificables de óxidos de colesterol. Sin embargo, cuando ésta es sometida a fritura a 170° C se detectan las formas 7 $\alpha$ -OH y 7 $\beta$ -OH colesterol y cuando la temperatura de cocinado asciende hasta 200° C, aparecen además los óxidos 5,6 $\alpha$ -epoxi, 7-keto y 25-OH colesterol. De forma similar, Gil et al.<sup>[6]</sup> demostraron que la cantidad de oxisteroles en carne de cerdo recién cocinada a la plancha, es significativamente inferior a la cuantificada sobre muestras sometidas a cocción o asado en horno. Dicho comportamiento apoya la teoría, de que la generación de óxidos de colesterol aumenta conforme se prolonga el período de calentamiento, propuesta por Chien et al.<sup>[19]</sup>

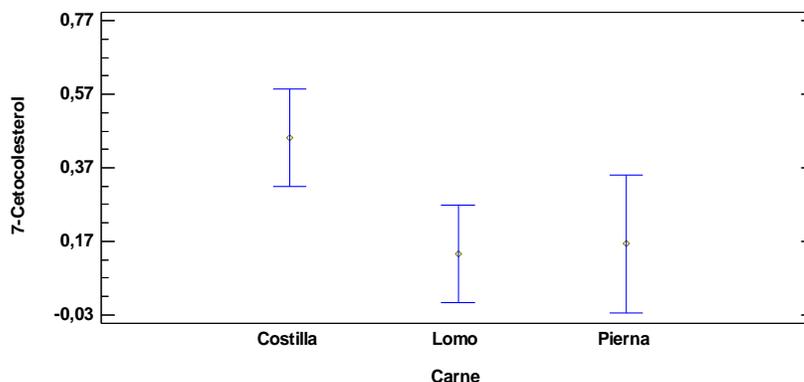


Figura 4: Influencia del tipo de carne de cerdo en la formación de COPs

## CONCLUSIONES

La identificación y cuantificación de 7-Cetocolesterol presentó los más altos niveles de concentración en muestras de frito pastuso preparadas con carne costilla sometida a fritura directa en grasa de cerdo, el 25-Hidroxicolesterol solo fue detectado en costilla preparada, costilla cruda y grasa de cerdo, pero a concentraciones muy bajas. El 6-Cetocolesterol no fue identificado lo cual concuerda con la bibliografía, pues pocas veces se reporta.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Velarde E. Gonzales A. Colesterol y óxidos de colesterol en carne de pollo. Departamento de ciencias. Pontificia Universidad Católica del Perú. Revista de química. (2006). 11-20
2. An. R. Acad. Nac. Farm., Óxidos de colesterol en alimentos cocinados con presencia habitual en nuestra dieta 2007, 73 (4): 1159-1174
3. Pie J., Spahis k., Seillan C. (1990). Evaluation of oxidative degradation of cholesterol in food and food ingredients: identification and quantificación of cholesterol oxides. J agric. Food chem. 38. 973-979
4. Gil M.D., Bañón S., Laencina J., Garrido M. (2004). Oxidación del Colesterol en Cárnicos: factores que determinan su formación. A. veterinaria. 20, 21-34.
5. Zhou, Q.; Wasowicz, E.; Handler, B.; Fleisher, L. Y Kummerov, F.A. (2000). An excess concentration of oxysterols in the plasma is cytotoxic to cultured endothelial cells. Atherosclerosis 149: 191-197.
6. García-Cruset, S.; Carpenter, K.L.; Guardiola, F.; Stein, B.K. Y Mitchinson, M.J. (2001). Oxysterols profiles of normal human arteries, fatty streaks and advanced lesions. Free Radical Res. 53(1): 31-41.
7. Valenzuela A., Sanhueza J., Nieto S. (2002). Oxidos de colesterol (oxisteroles): factores que condicionan su formación, efectos biológicos, y su presencia en alimentos. RevChilNutr. Vol. 29, N°2.
8. Echarte M. Conchillo A. Ansorena D. Astiasaran I. (2005). Óxidos de colesterol en alimentos frescos y congelados, crudos y a la plancha. Nutr. Hosp. 20. 293-296
9. Chen-Yi L. Diane W. (1995). Distribución of oxysterols in human serum: caracterización of 25-hydroxicholesterol association whit serum albumin. NutritionalBiochemistry. 6. 618-625.
10. Larkeson B, Dutta PC & Hansson I. (2000). Effects of frying and storage on cholesterol oxidation in minced meat products. J. Am. OilChem. Soc. 77, 675-680.
11. Daneshfar, A. Khezeli, T. Lotfi, H.J. (2009). Determination of cholesterol in foot samples using dispersive liquid-liquid microextraction followed by HPLC-UV. Journal of Chromatography B. 877. 456-460.
12. Lozada, J.J. Gil-Díaz, M. Santos-Delgado, M. Rubio-Barroso, S. Polo-Diez, L.M. (2011). Effect of electron beam irradiation on cholesterol oxide formation in different ready-to-eat-foods. InnovativeFoodScience and Emerging Technologies. 12. 519-525.
13. Lozada, J.J. (2012). Determinación de óxidos de colesterol en muestras de alimentos mediante cromatografía de gases. (Tesis doctoral). Universidad

Complutense de Madrid. Facultad de ciencias químicas. Departamento de química analítica. Madrid. 438 p.

14. Echarte, M., Zulet, A., and Astiasaran, I. (2001). Oxidation Process Affecting Fatty Acids and Cholesterol in Fried and Roasted Salmon. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49:5662-5667
15. Zhang, T. (2003). Cholesterol oxidation in roasted salmon fish with different cooking oils. (Tesis Doctoral). Louisiana State University. Department of food science. 72 p.
16. Addis, P.B., Warner, G.J. (1991). The potential health aspects of lipid oxidation products in food. En: *Free radicals and food additives*. Auroma, O., Halliwell, B. Eds. Taylor & Francis Ltd London, p 77-119.
17. Nam K.C., Du M., Jo C., Ahn D.U. (2001). Cholesterol oxidation products in irradiated raw meat with different packaging and storage time. *MeatSci*. 58: 431-435
18. Nourooz-Zadeh J., Appelquist L.A. (1987). Cholesterol oxides in Swedish foods and food ingredients: Fresh eggs and dehydrated egg products. *J. Food Sci*. 52, 57-67.
19. Chien J.T., Wang H.C., Chen B.H. (1998). Kinetic model of the cholesterol oxidation during heating. *J. Agr. Food. Chem*. 46: 2572-2577.