

EVALUACIÓN DE LOS FACTORES QUE INFLUYEN EN LA FORMACIÓN DE
ÓXIDOS DE COLESTEROL EN EL PROCESO DE PREPARACIÓN DE CARNE
DE POLLO COMERCIALIZADA EN LA CIUDAD DE PASTO.

DIANA ANDREA ORTEGA ORTEGA

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PASTO
2018

EVALUACIÓN DE LOS FACTORES QUE INFLUYEN EN LA FORMACIÓN DE
ÓXIDOS DE COLESTEROL EN EL PROCESO DE PREPARACIÓN DE CARNE
DE POLLO COMERCIALIZADA EN LA CIUDAD DE PASTO.

DIANA ANDREA ORTEGA ORTEGA

Trabajo de Grado presentado al comité curricular y de investigación al
departamento de química como requisito parcial para optar por el título de químico

DIRECTOR:

David Arturo Perdomo.
Químico

CO-DIRECTOR:

Juan Jose Lozada Castro
Doctor en Ciencias Químicas

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PASTO
2018

NOTA DE RESPONSABILIDAD

“Las ideas y conclusiones aportadas en la tesis de grado son responsabilidad exclusiva del autor”

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

DAVID ARTURO PERDOMO

Director

JUAN JOSE LOZADA CASTRO

Co-director

JUAN CAMILO VARGAS

Jurado

WILLIAM ALBARRACIN

Jurado

San Juan de Pasto, 11 de Mayo del 2018

AGRADECIMIENTOS

Al director del presente trabajo de investigación: David Arturo Perdomo, por la asesoría y amistad brindada, por compartir sus conocimientos y enseñanzas, y por su vital colaboración en el desarrollo de la investigación.

Al grupo de investigación estudio de sistemas contaminantes (GIESIC), principalmente a su director, Juan José Lozada Castro Ph.D por el espacio brindado en el grupo de investigación.

A los profesores Juan Camilo Vargas y William Albarracín por su colaboración en la evaluación del presente trabajo de investigación.

A la Magister Sandra Echeverry por su grata colaboración y conocimientos brindados en la temática de alimentos, fundamentales para el desarrollo del presente trabajo de investigación.

A la Doctora Elena Ibáñez del instituto de investigación en ciencias de la alimentación CIAL-CSIC de la Universidad Autónoma de Madrid, por su atención y apoyo brindado.

A la sección de laboratorios especializados de la Universidad de Nariño, especialmente al doctor German Chávez, y los Químicos David Arturo, Juan Pablo Jiménez y Jessica Basante por su colaboración y amistad brindada.

A la Universidad de Nariño, el departamento de Química, el personal docente, por su aporte académico y enseñanzas para mi formación profesional.

A mi Padres Jaime y Esmeralda y a mi hermana Laura por su educación para ser una persona íntegra, por el apoyo y amor incondicional.

A mis Amigos, Daniel, Manuela, Viviana, Morita, Marlon, Ingrid, por su amistad sincera e incondicional en cada momento de mi vida.

A mi compañero de vida y de amor Jose por ser mi fortaleza e inspiración.

DEDICATORIA

A mi Padre Jaime Ortega por ser sustento y pilar de nuestra familia, por su gran apoyo y amor brindado en cada paso de mi vida, por su gran sabiduría y educación impartida para ser mejor persona, por ser mi maestro de vida.

A mi Madre Esmeralda Ortega por su amor incondicional, por ser mi fortaleza y mi fuerza para seguir adelante, por ser mi ejemplo de perseverancia, por ser la razón de mi vida.

A mi hermana Laura Ortega por ser mi confidente de vida, por su gran apoyo y cariño brindado.

A mi abuelo Serafín, por su apoyo y amor brindado y mis abuelos Stella, Teresa, Vicente y mi nana Maura por ser ejemplos de vida y de amor, aunque ya no estén conmigo, esperaron lo mejor de mí.

A mis Amigos, especialmente a Daniel, Manuela, Marlon y Jorge por su amistad.

A mi Novio Jose Ortiz, por su apoyo y amor incondicional en cada paso de mi vida, por brindarme inspiración.

RESUMEN

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en el mundo y están asociadas al consumo de alimentos con alto contenido de grasas y colesterol. Diferentes factores como la temperatura de cocción, almacenamiento y conservación de los alimentos inducen a la oxidación del colesterol, dando origen a la formación de numerosos compuestos potencialmente tóxicos para la salud denominados óxidos de colesterol (COPs). Este tipo de compuestos inciden en problemas de salud y enfermedades, tales como lesiones arterioscleróticas. Además presentan actividad carcinógena, citotóxica y angiotoxica. Teniendo en cuenta lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue la determinación de COPs en muestras de carne de pollo sometidas a procesos de fritura que se comercializan en la ciudad de Pasto - Colombia.

Se determinaron los óxidos de colesterol: 5-colesten-3 ,25-diol (25-hidroxicolesterol), 5-Colesten-3 ,7 -diol (7 -Hidroxicolesterol) y 3 -hidroxi-5-colesten-7-ona (7-Cetocolesterol), mediante extracción en fase solida SPE con cartuchos C18 y análisis por cromatografía líquida HPLC-PDA en fase reversa. Los factores estudiados en el proceso de preparación fueron: tipo de aceite de fritura, tiempo de cocción, tipo de pieza y tiempo de venta. Lo anterior se realizó por medio de un diseño experimental factorial, con dos niveles por factor; en dos bloques con un total de 32 experimentos. El 25-Hidroxicolesterol estuvo presente en todos los experimentos analizados. La concentración más alta se determinó en los factores: tipo de pieza pechuga, aceite reutilizado y tiempos de fritura de 40 minutos.

Asimismo, con el fin de determinar los niveles de COPs en la carne de pollo lista para el consumo y comercializadas, en puntos de venta, se realizaron análisis de muestras en diferentes sectores de la ciudad de Pasto. En este estudio se determinó valores promedio de COPs, de 4,40 $\mu\text{g/g}$ y 1.48 $\mu\text{g/g}$, determinados en los tipos de pieza pechuga y contramuslo respectivamente.

Palabras Clave: Óxidos de Colesterol, HPLC, Diseño experimental, Carne de pollo, SPE.

ABSTRACT

Cardiovascular diseases are the leading cause of death in the world and are associated with the consumption of foods with high in fat and cholesterol. Different factors such as the temperature of cooking, storage and preservation of foods induce the oxidation of cholesterol, leading to the formation of many compounds potentially toxic to health called oxides of cholesterol (COPs). This type of compounds affect health problems and diseases, such as arteriosclerotic lesions. They also have carcinogenic, cytotoxic and angiotoxic activity. Taking into account the above, the aim of this work was the determination of COPs in samples of chicken meat subjected to frying processes marketed in the city of Pasto-Colombia.

The cholesterol oxides were determined: 5-cholesten-3,25-diol (25-hydroxycholesterol), 5-Colesten-3,7-diol (7-Hydroxycholesterol) and 3-hydroxy-5-cholesten-7-one (7-Cetocholesterol), by extraction in solid phase SPE with C18 cartridges and analysis by liquid chromatography HPLC-PDA in reverse phase. The factors studied in the preparation process were: type of frying oil, cooking time, type of piece of chicken meat and time of sale. This was done through a factorial experimental design, with two levels per factor; in two blocks with a total of 32 experiments. 25-Hydroxycholesterol was present in all the experiments analyzed. The highest concentration was determined in the factors: type of chicken breast piece, reused oil and frying times of 40 minutes.

Likewise, in order to determine the levels of COPs in ready-to-eat chicken meat sold at points of sale, samples were analyzed in different sectors of the city of Pasto. In this study, average POP values were determined, of 4.40 $\mu\text{g} / \text{g}$ and 1.48 $\mu\text{g} / \text{g}$, determined in chicken meat piece of the types of breast and drumstick respectively.

Keywords: Cholesterol oxides, liquid chromatography, Experimental design, chicken meat, SPE.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCION	20
1. OBJETIVOS.....	23
1.1 Objetivo General	23
1.2 Objetivos Específicos	23
2. ESTADO DEL ARTE	24
2.1. Fundamentos teóricos	24
2.1.1. Colesterol.....	24
2.1.2 El colesterol en alimentos	26
2.1.3. Productos de oxidación del colesterol	27
2.1.4 Síntesis de óxidos del colesterol	30
2.1.5. Implicaciones sobre la salud de los óxidos de colesterol	40
2.1.6. Colesterol en carne de pollo	41
2.1.7 Técnicas Analíticas para Análisis de COPs	44
2.1.7.1. Extracción en Fase Solida	44
2.1.7.2 Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC).....	44
2.1.7.3 Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas ...	45
2.1.8 Técnicas Cromatograficas Aplicadas Para el Análisis de COPs	47
2.1.8.1. Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) Aplicada para el Análisis de COPs.....	47
2.1.8.2 Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas Aplicada para Análisis de COPs	48
2.1.9. Diseño experimental	53
2.1.9.1. Tipos de diseño experimental	53
2.2 Validación de una Técnica Analítica	54
3. METODOLOGIA.....	55
3.1. Materiales y Reactivos	55
3.1.1. Descripción de Reactivos.....	55
3.1.1.1. Estándares	55

3.1.1.2. Disolventes	56
3.1.1.3 Reactivos	56
3.1.2. Materiales y Equipos	57
3.1.2.1. Materiales	57
3.1.2.1.1. Materiales para Preparación de Muestras	57
3.1.2.1.2. Equipos	57
3.1.2.2. Equipos Cromatográficos.....	57
3.1.2.2.1 Cromatógrafo de Líquidos de Alta Eficiencia	57
3.2. Desarrollo del Método	59
3.2.1. Montaje de la técnica por HPLC.	59
3.3. Revisión del Método Cromatográfico.....	61
3.3.1. Linealidad	61
3.3.2. Selectividad.....	61
3.3.3. Precisión	62
3.3.3.1. Repetibilidad	62
3.3.3.2. Reproducibilidad	62
3.3.4. Exactitud	62
3.3.5. Sensibilidad.....	62
3.4. Diseño Experimental para el Análisis de COPs en Carne de Pollo:	63
3.5. Análisis Estadístico	67
3.5.1. Análisis del Diseño Experimental	67
3.5.2. Análisis de Correlaciones COPs - Parámetros Bromatológicos y Factores.....	67
3.6. Preparación de las Muestras para la Determinación de los Factores que Influyen a la Formación de COPs por HPLC.....	69
3.6.1. Muestras	69
3.6.2. Extracción de los Lípidos	69
3.6.2.1. Lixiviación:.....	69
3.7. Determinación de COPs mediante HPLC en muestras de carne de Pollo	70

3.7.1. Extracción en fase sólida (SPE) con cartucho C18	70
3.8. Determinación de Colesterol mediante HPLC en muestras de Carne de Pollo	71
3.9. Preparación de muestras de aceite vegetal nuevo y usado.....	72
3.10. Determinación de COPs en muestras de Carne de pollo tipo <i>broaster</i> comercializada en la Ciudad de Pasto.	72
3.11. Análisis de COPs por GC-MS.....	73
3.12. Determinación de Parámetros Bromatológicos de la Muestra	74
3.13. Transformación Térmica del Colesterol en sus óxidos y Actividad Antioxidante	74
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	76
4.1. Condiciones Cromatográficas	76
4.2. Evaluación del Método	78
4.2.1. Linealidad	78
4.2.2. Sensibilidad.....	81
4.2.2.1. Límite de Detección y Límite de Cuantificación	81
4.2.3. Precisión y Límites de Confianza	82
4.2.3.1. Repetibilidad	82
4.2.3.2. Reproducibilidad	84
4.2.4. Exactitud	85
4.3. Niveles de Colesterol y COPs en Materias Primas y en la Carne de Pollo	86
4.3.1. Colesterol en Materias primas.....	86
4.3.2. COPs en Materias Primas	88
4.4. Parámetros Bromatológico de la Carne de Pollo	92
4.5. Evaluación de los Factores que Influyen en la Formación de COPs	96
4.5.1. Descripción del Factor Tipo de Aceite e Interacción Aceite-Tiempo de Fritura	102
4.5.2. Contenidos de COPs en Experimentos con Aceite Nuevo	108
4.5.3. Contenidos de COPs en Experimentos con el Factor Tipo de Pieza.....	109

4.5.4	Contenidos de COPs en Experimentos con el Factor Tiempo de Venta.	110
4.5.5.	Análisis de Correlaciones	110
4.5.6.	Análisis del Contenido de COPs Detectados en Piezas Fritas de Carne de Pollo.	113
4.5.7.	Análisis de Componentes Principales (PCA)	119
4.5.8	Análisis por Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas GC-MS	121
4.6.	Análisis de Muestras Comercializadas en la Ciudad de Pasto.	123
4.6.1	Análisis de COPs en Muestras Comercializadas en la Ciudad de Pasto por GC-MS.	130
4.7.	Transformación Térmica del Colesterol en sus Oxidos.	131
4.7.1.	Transformación del Colesterol	131
4.7.2.	Efecto Antioxidante del Extracto Etanólico de Romero (<i>Rosmarinus officinalis</i>)	134
	CONCLUSIONES	142
	RECOMENDACIONES	144
	BIBLIOGRAFIA	145
	ANEXOS	155

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Contenido de Colesterol en Alimentos	26
Tabla 2: Formación de productos de oxidación del colesterol en alimentos afectados por varios tratamientos	32
Tabla 3: Análisis de óxidos de Colesterol (COPs) por diferentes técnicas Cromatográficas en diferentes matrices	49
Tabla 4: Especificaciones del Equipo Cromatográfico HPLC para Análisis de Colesterol y COPs-Laboratorio de Cromatografía –Universidad de Nariño	57
Tabla 5: Especificaciones del Equipo Cromatográfico GC-MS para Análisis de Colesterol y COPs-Laboratorio de Cromatografía –Universidad de Nariño.	58
Tabla 6: Parámetros de la fase móvil. Composición para separación de COPs ...	60
Tabla 7: Parámetros de la fase móvil. Composición para la separación de Colesterol.....	61
Tabla 8: Factores y Niveles del diseño experimental.	64
Tabla 9: Resumen del Diseño Experimental.	65
Tabla 10: Diseño Experimental con 2 puntos centrales	66
Tabla 11: Análisis Bromatológico	74
Tabla 12: Descripción de Ensayos Extracto Antioxidante	75
Tabla 13: Condiciones de HPLC en Fase Reversa para el Análisis de COPs y Colesterol.....	76
Tabla 14: Parámetros de Separación de los Picos Cromatograficos	78
Tabla 15: Parámetros de las Rectas de Calibración de COPs	81
Tabla 16: Límite de Detección y Límite de Cuantificación	82
Tabla 17: Repetibilidad de los COPs.....	83
Tabla 18: Reproducibilidad de los COPs.....	84
Tabla 19: Porcentaje de Recuperación.	85
Tabla 20: Concentración de Colesterol en Materias Primas	86
Tabla 21: COPs en Materias Primas	89
Tabla 22: Parámetros Bromatológicos de Carne de Pollo Crudo	93
Tabla 23: Parámetros Bromatológicos en Carne de Pollo tipo Broaster.....	93
Tabla 24: Resultados del Diseño Experimental.....	97
Tabla 25: ANOVA.....	98
Tabla 26: Pruebas de Rangos Múltiples para COPs Totales	106
Tabla 27: Matriz de Correlaciones de Parametros Bromatologicos.....	110
Tabla 28: Matriz de Correlaciones de Los Factores Estudiados.	112
Tabla 29: Análisis de Componentes Principales	119
Tabla 30: Identificación de los TMS-derivados de COPs por GC-MS. Experimento N° 18.....	122

Tabla 31: Análisis de Muestras,	124
Tabla 32: Tabla ANOVA Análisis de Muestras	126
Tabla 33: Humedad de las piezas de pollo en cada sector	129
Tabla 34: Identificación de los TMS-derivados de COPs por GC-MS. Muestra Zona Norte	130
Tabla 35: Resultados de Experimentos Degradación Colesterol	131
Tabla 36: Formación de COPs	132
Tabla 37: Efecto Antioxidante en la formación de COPs.....	136
Tabla 38: Resultados Efecto Antioxidante en Patrón de Colesterol	137
Tabla 39: Resultados Efecto Antioxidante en Pollo Crudo	138
Tabla 40: Resultados Efecto Antioxidante en Aceite Nuevo	139
Tabla 41: Resultados Efecto Antioxidante en Aceite Reutilizado.	140

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura Química del Colesterol	24
Figura 2: Posición del Colesterol entre las Moléculas de Fosfolípidos en la Membrana Celular	25
Figura 3: Principales Oxidos de Colesterol	28
Figura 4: Posiciones de la Molécula de Colesterol Susceptibles al Ataque Oxidativo	31
Figura 5: Principales rutas de Síntesis de COPs en Carne y Derivados.....	34
Figura 6: Productos de la Auto-oxidación del Colesterol	37
Figura 7: Fotooxidación del Colesterol.....	39
Figura 8: Cortes de la Carne de Pollo.....	42
Figura 9: Esquema de un Cromatografo de Gases.....	46
Figura 10: Reacción de derivatización para análisis por GC-MS:	48
Figura 11: Procedimiento Metodológico General	55
Figura 12: Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiencia, HPLC.	58
Figura 13: Cromatógrafo de Gases-Masas Shimadzu GC-MS QP2010.	59
Figura 14: Parámetros Fase Móvil	60
Figura 15: Diagrama General para la Preparación y Análisis de las Muestras de Carne de Pollo tipo Broaster	68
Figura 16: Agitación en Cloroformo por 18 Horas.....	69
Figura 17: Filtración	70
Figura 18: Cartuchos C18 utilizados para SPE.....	71
Figura 19: Cartucho Silica Para la determinación de Colesterol mediante SPE. ..	72
Figura 20: Sistema Térmico para Derivatización	73
Figura 21: Cromatogramas de la mezcla de Estándares de 10 ppm a 205 y238 nm	77
Figura 22: Cromatograma Estándar de Colesterol a 205 nm.....	77
Figura 23: Cromatogramas Análisis de Colesterol en Materias Primas	87
Figura 24: Cromatogramas de COPs en Materias Primas	90
Figura 25: Absorción del Aceite en Alimentos Fritos.....	95
Figura 26: Cromatograma Experimento 12 a 205-238 nm.....	100
Figura 27: Cromatograma Experimento 18 a 205 - 238 nm.....	101
Figura 28: Gráfico de Barras Aceite Vs COPs	102
Figura 29: Termocupla para la determinación de Temperatura de freído en el Diseño de Experimentos.....	103
Figura 30: Grafico de Barras Interacción Aceite - Fritura Vs COPs	104
Figura 31: COPs en Aceite Nuevo	108

Figura 32: Grafico de Barras de la concentración de 25-OH Vs Tipo de Aceite .	114
Figura 33: Mecanismo de Formación del 25-OH.....	115
Figura 34: Mecanismo de Formación del 7 -OH y 7-Ceto.....	117
Figura 35: Gráfico de Barras de la concentración de 7 -OH y 7-Ceto Vs Tipo de Aceite.....	118
Figura 36: Cromatograma de Iones Totales Muestra Diseño Experimental (Experimento 18).	121
Figura 37: Espectros de masas Experimentales de los COPs identificados en la muestra del experimento 18.....	122
Figura 38: Aceite Reutilizado de un Establecimiento Comercial	125
Figura 39: Cromatograma de iones totales Muestra Zona Norte	130
Figura 40: Cromatograma Degradación del Colesterol de acuerdo a Temperatura y Tiempo.	132
Figura 41: Diagrama de Barras formación de 25-OH.....	133
Figura 42: Diagrama de Barras formación de 7 -OH.....	133
Figura 43: Cromatograma de Comparación patrón de Colesterol con patrón de colesterol con Romero	137
Figura 44: Cromatograma de Comparación pollo crudo y pollo crudo con extracto de romero	138
Figura 45: Cromatograma de Comparación Aceite Nuevo y Aceite Nuevo con Romero	139
Figura 46: Cromatograma de Comparación Aceite Reutilizado y Aceite Reutilizado con Romero.	140

LISTA DE GRAFICAS

Grafica 1: Curvas de Calibración Para COPs y Colesterol	79
Gráfica 2: Diagrama de Pareto para COPs Totales	99
Gráfica 3: Efectos Principales para COPs totales.....	99
Gráfica 4: Graficas de Medias de Fisher al 95%.....	105
Grafica 5: Diagrama de Dispersión de la Matriz.....	111
Grafica 6: Diagrama de Dispersión de la Matriz.....	112
Grafica 7: Bigráfica Análisis de COPs.....	120
Grafica 8: Gráfica de sedimentación	120
Grafica 9: Gráfico de Caja y Bigotes.....	126
Gráfica 10: Gráfico de Dispersión	126
Gráfica 11: Gráfico de Barras Comparación de Tipo de Pieza	127
Grafica 12: Gráfico de Barras Concentración de COPs por pieza en cada Sector	129

LISTA DE ANEXOS

Anexo A: Presentación al Congreso Argentino de Química Analítica.....	155
Anexo B: Cromatogramas comparativos HPLC-PDA de los estándares de óxidos de colesterol en materias primas.	156
Anexo C: tabla ANOVA.....	161
Anexo D: Diagramas de Fisher al 95% de los factores.....	162
Anexo E: Grafica de superficie de respuesta y ecuación del diseño.....	164
Anexo F: Cromatogramas comparativos HPLC-PDA de las muestras del diseño experimental con estándares de COPs.	165
Anexo G: Espectros de masas por GC-MS de estándares de COPs.....	166
Anexo H: Cromatograma de masas por GC-MS de una muestra tomada en la zona Norte.	168
Anexo I: Cromatogramas comparativos de HPLC-PDA de experimentos con extracto de Romero.	169

LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRONIMOS

ACN	Acetonitrilo
ANOVA	Análisis de varianza
C ₈	Octilsilano
CHCl ₃	Cloroformo
COPs	Productos de oxidación del colesterol
Et ₂ O	Éter dietílico
ER	Extracto de Romero
GC-MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
Hex	Hexano
HPLC-PDA	Cromatografía líquida de alta eficacia con fotoarreglo de diodos
IPA	Isopropanol
ND	No Detectado
Na ₂ SO ₄	Sulfato de sodio
PDA	Análisis de Componentes Principales (Sigla en Inglés)
r ₂	Coefficiente de regresión
RSD	Desviación estándar relativa (Sigla en Inglés)
SD	Desviación estándar
SPE	Extracción en fase sólida
Tri-Sil	Reactivo derivatizante
Ta	Tipo de Aceite
Tp	Tipo de Pieza
Tv	Tiempo de Venta
Tf	Tiempo de Fritura
25-OH	25-hidroxicolesterol
7 -OH	7 -Hidroxicolesterol
7-ceto	7-cetocolesterol
5 ,6 -ep	5,6 -epoxi colesterol
5 ,6 -ep	5,6 -epoxi colesterol

GLOSARIO

Analito: Sustancia objeto de estudio para su detección, identificación y/o cuantificación así como sus derivados.

ANOVA: Análisis de Varianza estadístico en el cual se comparan más de dos medias entre sí.

Exactitud: Grado de concordancia entre el resultado del ensayo y un valor de referencia.

Límite de detección: concentración mínima obtenida a partir de la medida de una muestra que puede ser detectada por un método analítico.

Límite de Cuantificación: cantidad de analito que proporciona una señal igual a la del blanco más diez veces la desviación estándar del blanco

Oxidos de Colesterol: Productos de oxidación del colesterol

PCA: es una técnica estadística de síntesis de la información, o reducción de la dimensión en número de variables.

Precisión: Nivel de concordancia entre varios resultados de ensayo independientes obtenidos bajo condiciones predeterminadas.

Repetibilidad: Condiciones en la que un mismo operador o analista obtiene resultados de ensayos independientes para métodos iguales, con los mismos equipos e idénticas muestras a analizar.

Varianza: Medidas de dispersión de datos, se define como el cuadrado de la desviación estándar.

INTRODUCCION

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. Es componente esencial de las membranas plasmáticas y precursor de lipoproteínas, sales biliares, vitamina D y hormonas (sexuales y corticoesteroides),¹ por su estructura planar rígida contribuye a la estabilización de la estructura de la membrana celular. 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 óxidos de colesterol, denominados COPs.²

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^{3,4}; de los cuales ocho son los más estudiados: 7 -hidroxicolesterol, 7 -hidroxicolesterol 7-cetocolesterol, 20 y 25-hidroxicolesterol, 5 ,6 -epoxicolesterol, 5 ,6 -epoxicolesterol y colestanol^{5,6}. Diversas investigaciones indican que estos compuestos tienen potenciales efectos nocivos para la salud. Estudios han demostrado que el -epoxicolesterol, es

¹ ARGÜESO R., Díaz JL., Díaz JA., Rodríguez A., Castro M., Diz-Lois F. Lípidos, colesterol y lipoproteínas. En: Galicia Clin 2011; 72 (Supl. 1): S7-S17

² NAWAR W. Lipids: En Food Chemistry. Ed Fenema O.R. Marcel Dekker. New York. 1985.

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

⁴ PIE J., Spahis k., Seillan C. Evaluation of oxidative degradation of colesterol in food and food ingredients: identification and quantificación of cholesterol oxides. J agric. Food chem. 1990. 38. 973-979

⁵ 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.

⁶ GARCÍA-CRUISET, 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.

causante de lesiones arterioscleróticas y presenta actividad carcinógena⁷. El 25-hidroxicolesterol y el colestanoetriol (colesteno-3 -5 -6 -triol) poseen actividad citotóxica y angiotoxica^{8,9}, otros estudios *in vivo* han puesto de manifiesto que la intensidad de las lesiones ateroscleróticas inducidas por la ingesta de elevadas dosis de COPs es 10 veces superior a la producida por dietas ricas en colesterol¹⁰.

Asimismo, los factores nutricionales y de la dieta, están asociados con los índices de mortalidad y morbilidad por enfermedades cardiovasculares (ECV), es por ello, que el consumo excesivo de alimentos con altos contenidos de grasas saturadas y colesterol contribuye al aumento de las incidencias de las ECV¹¹. En Colombia, el Ministerio de Salud y Protección Social en el año 2011, reportó que las ECV fueron la causa de muerte de 60.000 colombianos. En la Ciudad de Pasto, estudios realizados por la Secretaria Municipal de Salud reportaron que, entre Enero de 1998 y Diciembre de 2013, 9.279 muertes no fatales correspondieron a enfermedades crónicas, representando un porcentaje del 30% al 41% de la mortalidad comprendida en este periodo. Dentro de las enfermedades crónicas, las ECV son las responsables de la mayor parte de las muertes en la Ciudad¹².

Teniendo en cuenta lo anterior, el consumo excesivo de alimentos (principalmente carnes rojas y blancas) con apreciables contenidos de colesterol y en cuyos procesos de preparación son sometidos a procesos de fritura, son causas que influyen en el aumento de ECV y otras enfermedades crónicas. En la Ciudad de Pasto, el consumo de carnes blancas es apreciable, principalmente la carne de pollo adobada y frita, comúnmente llamada pollo a *la broaster*. También se encuentran otras formas de preparación y cocción como es el denominado pollo asado. Este tipo de carnes, en sus procesos de preparación y comercialización

⁷ GUARDIOLA, F., et al. Biological effects of oxysterols: current status. *Food and Chemical Toxicology*, 1996, vol. 34, no 2, p. 193-211.

⁸ BROWN M., GOLDSTEIN J. Suppression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity and inhibition of Growth of human fibroblasts by 7-Ketocholesterol En: *The Journal of Biological Chemistry* (1974). Vol. 249, p. 7306-7314.

⁹ LEHMANN J. *et al.* Activation of the Nuclear Receptor LXR by Oxysterols Defines a New Hormone Response Pathway En: *The Journal of Biological Chemistry* (1997). Vol. 272, p. 3137-3140.

¹⁰ PENG, Shi-Kaung; TAYLOR, C. Bruce. Cholesterol autoxidation, health and arteriosclerosis. En: *Nutritional Considerations in a Changing World*. Karger Publishers, 1984. p. 117-154.

¹¹ BRENNA Thomas. *et al.* Grasas y ácidos grasos en nutrición humana. Granada. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Fundación Iberoamericana de Nutrición (FINUT). 2012. 204 p. no. 91 ISBN 978-92-5-3067336

¹² GUERRERO H. *et al.* Perfil epidemiológico de enfermedades crónicas para la toma de decisiones en Pasto. En: *Observatorio de Enfermedades Crónicas de Pasto*. No.4. 2015.

para su consumo, son sometidos a diferentes factores (tiempo y temperatura de fritura, conservación y uso de aceite reutilizado) que inducen a la formación de los COPs, que por sus reconocidos efectos adversos para la salud, pueden llegar a constituirse en un factor de riesgo para la salud pública.

En el presente trabajo de investigación se realizó la determinación de óxidos de colesterol en carne de pollo tipo *broaster* comercializada en la ciudad de Pasto, estudiando los factores que influyen en su formación durante el proceso de preparación y comercialización de este alimento. Los factores estudiados fueron: tipo de pieza, tipo de aceite usado, tiempo de cocción y tiempo de venta. Para la extracción e identificación de los COPs en las muestras, se utilizaron metodologías analíticas de extracción sólido-líquido, purificación mediante (SPE), y el uso de la cromatografía líquida HPLC como técnica de análisis.

1. OBJETIVOS

1.1 Objetivo General

Evaluar los factores que influyen en la formación de los COPs en el proceso de preparación de carne de pollo comercializada en la ciudad de pasto.

1.2 Objetivos Específicos

- Identificar y cuantificar los óxidos de colesterol presentes en la preparación de la carne de pollo tipo (*Broaster*) por técnicas cromatográficas.
- Correlacionar la influencia de los factores: temperatura, tiempo y frecuencia de uso del aceite en la formación de óxidos de colesterol en la carne de pollo (tipo *broaster*) comercializada en la ciudad de Pasto mediante análisis estadístico.

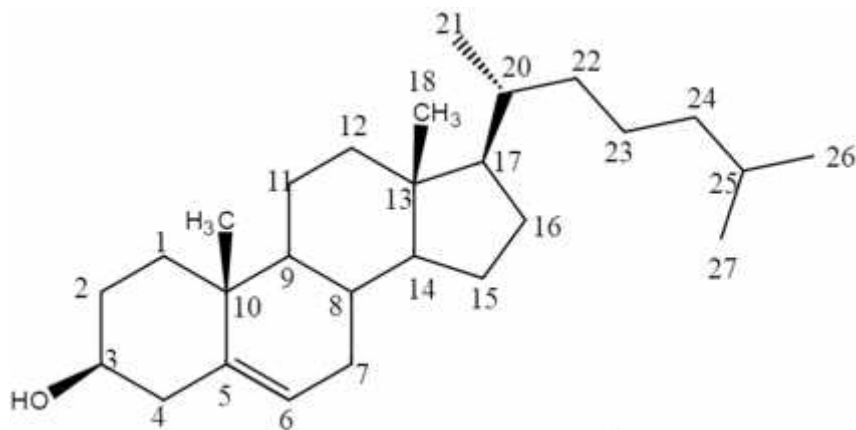
2. ESTADO DEL ARTE

2.1. Fundamentos teóricos

2.1.1. Colesterol

El colesterol (5-colestano-3 -ol) es el esteroide más abundante en los animales, se clasifica como un estero por la presencia de un hidroxilo (OH) en el C3 y su cadena lateral alifática de 8 a 10 átomos de carbono¹³. Está presente en el tejido humano y en el tejido animal fue aislado por primera vez en el siglo XVII e incluido en la categoría de los lípidos o grasas; es junto con los fosfolípidos uno de los componentes más importantes de las membranas celulares. Cumple numerosas funciones en el organismo humano, participa en la formación de hormonas sexuales, ácidos biliares que cumplen un rol importante en la digestión y absorción de las grasas en el tracto digestivo¹⁴.

Figura 1. Estructura Química del Colesterol



Fuente: Velarde, E. (2006)¹⁵

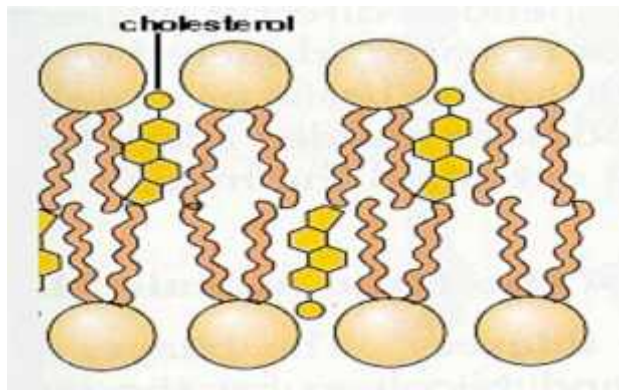
¹³UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO. Esteroides. [en línea]. <http://bq.unam.mx/~evazquez> [citado en 2 de diciembre de 2016].

¹⁴VELARDE E., González A. Colesterol y Óxidos de Colesterol en Carne de Pollo En: Revista de Química. Pontificia Universidad Católica Del Perú. (2006). p. 11-20.

¹⁵Ibid., p. 12.

El colesterol cumple numerosas funciones metabólicas como lo son: constituye la estructura básica para la formación de las hormonas esteroideas, a partir de él se forman 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). De hecho, se estima que de cada dos o tres moléculas de fosfolípidos que forman la matriz lipídica de las membranas, existe una molécula de colesterol¹⁶.

Figura 2: Posición del Colesterol entre las Moléculas de Fosfolípidos en la Membrana Celular



Fuente: Lozada J. (2013)¹⁷

En la figura 2, se indica la posición del colesterol entre las moléculas de los fosfolípidos en la membrana celular, también en este caso, la molécula de colesterol juega un papel muy importante, ya que controla la fluidez de las membranas. La oxidación del colesterol puede alterar esta permeabilidad de la membrana llevándola a sufrir procesos de Necrosis o Apoptosis¹⁸.

¹⁶ LOZADA CASTRO Juan. Determinación de Óxidos de Colesterol en Muestras de Alimentos Mediante Cromatografía de Gases. Madrid, 2013, p. 1-438. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid Facultad de Ciencias Químicas Departamento Ciencia de Química Analítica.

¹⁷ Ibid., p. 11

¹⁸ Ibid., p. 43

2.1.2 El colesterol en alimentos

El colesterol es un esteroide que se constituye como el componente esencial de la membrana celular y es precursor de las hormonas esteroideas, varias vitaminas y la bilis. También es el componente esencial de la mielina que recubre a los nervios y de esta manera permite la conducción del impulso eléctrico para asegurar la correcta respuesta por parte de los tejidos efectores. Una fracción del colesterol se obtiene de los alimentos, pero la mayor proporción se sintetiza en el hígado y de allí pasa a la circulación general, siendo transportado por las lipoproteínas, las cuales son de diferente peso molecular¹⁹.

Una gran variedad de alimentos de origen animal contienen colesterol, que al procesarse forma productos de oxidación. Sin embargo, estos productos también pueden formarse cuando los alimentos, por razones de conservación, son expuestos a tratamientos físicos como calor, radiación o almacenamiento^{20,21}.

En la tabla N°1 se consigna la presencia de colesterol en algunos alimentos.

Tabla 1: Contenido de Colesterol en Alimentos

CONTENIDO DE COLESTEROL	ALIMENTOS
Muy alto contenido en colesterol (más de 200 mg)	Embutidos, caviar, yema de huevo, manteca, quesos con mucho tiempo de maduración
Alto contenido de colesterol (100-200mg)	Queso crema, quesos frescos, langosta, langostino, camarones.
Moderado contenido en colesterol (50-99mg)	Pollo, Pescado, mayonesa, Pulpo, carne de cerdo.
Bajo contenido en colesterol (menos de 50mg)	Leche, queso desnatado.
Nulo contenido en colesterol	Frutas, verduras, semillas, arroz, pasta.

Fuente: Gottau G. (2016)²²

¹⁹ KRESGE, Nicole; SIMONI, Robert D.; HILL, Robert L. The biosynthetic pathway for cholesterol: Konrad Bloch. En: Journal of Biological Chemistry, 2005, vol. 280, no 10, p. 138-280.

²⁰ PANIANGVAIT, P., et al. Cholesterol oxides in foods of animal origin. En: Journal of Food Science, 1995, vol. 60, no 6, p. 1159-1174.

²¹ TAI, C.-Y.; CHEN, Y. C.; CHEN, B. H. Analysis, formation and inhibition of cholesterol oxidation products in foods: an overview (part II). En: Journal of Food and Drug Analysis, 2000, vol. 8, no 1.

²² GOTTAU G. Los alimentos Agrupados según su nivel de Colesterol. [en línea]. <https://www.vitonica.com/alimentos/los-alimentos-agrupados-segun-su-nivel-de-colesterol>. [citado en 1 de Diciembre de 2016].

2.1.3. Productos de oxidación del colesterol

Según Morel y Lin²³ 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 autooxidación, 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 oxidación²⁴. Investigaciones realizadas por Zhang²⁵ han demostrado que 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. La formación de estos compuestos puede alterar las propiedades nutricionales de los alimentos, al interactuar con las proteínas y vitaminas que contienen.

El colesterol es susceptible de sufrir reacciones de oxidación dando origen a hidroperóxidos que al descomponerse, forman productos secundarios de oxidación denominados óxidos de Colesterol o COPs. De los cuales se han identificado más de 60 compuestos. Entre los principales óxidos de colesterol están: 7-cetocolesterol (7-ceto), 6-cetocolestanol (6-ceto), 7 -hidroxicolesterol (7 -OH), 7 -hidroxicolesterol (7 -OH), 5,6 -epoxicolesterol (5,6 -EP), 5,6 -epoxicolesterol (5,6 -EP), 25-hidroxicolesterol (25-OH), 20-hidroxicolesterol (20-OH) y colestanoltriol (triol)²⁶.

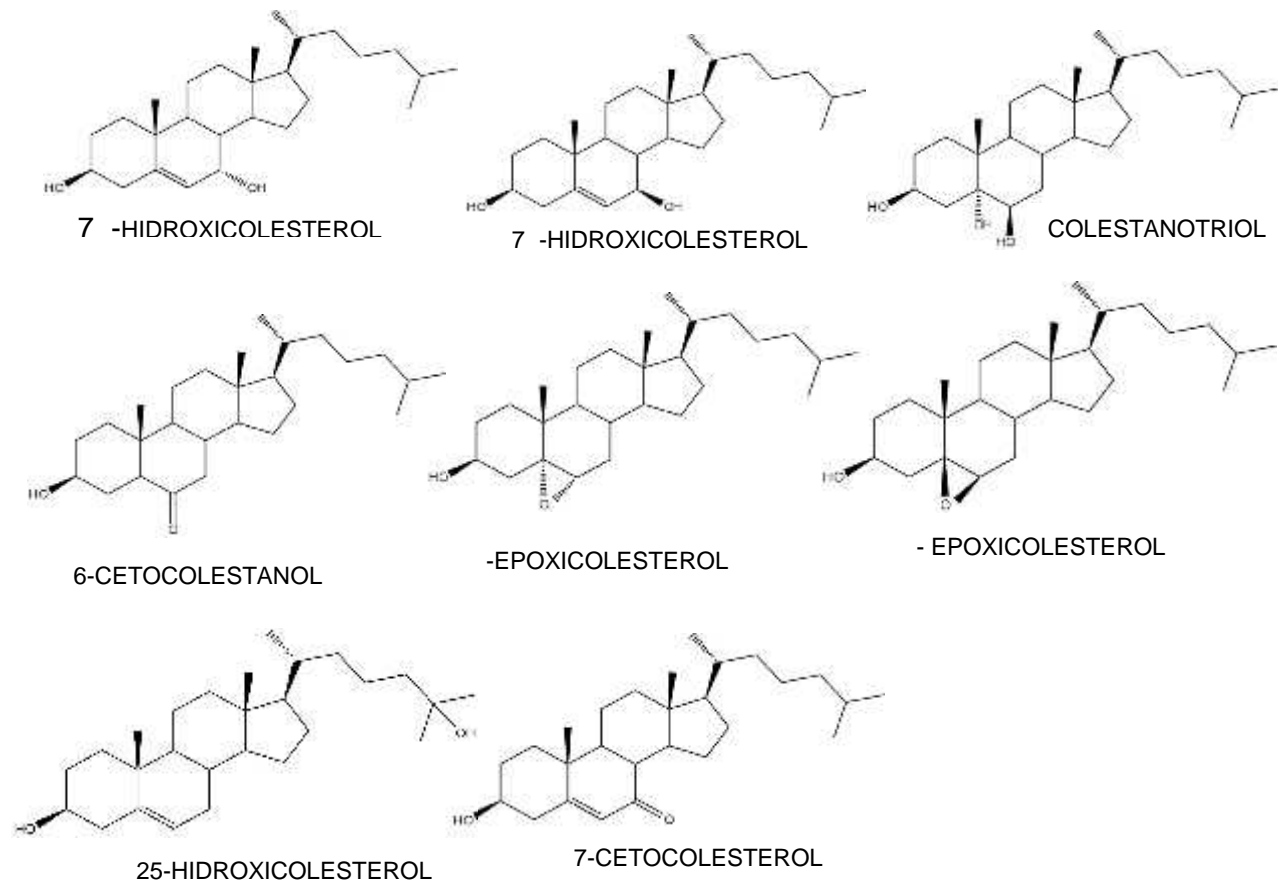
²³ MOREL, Diane W.; LIN, Chen Yi. Cellular biochemistry of oxysterols derived from the diet or oxidation in vivo. En: The Journal of Nutritional Biochemistry, 1996, vol. 7, no 9, p. 495-506.

²⁴ CAREY, Martin C.; SMALL, Donald M.; BLISS, Charles M. Lipid digestion and absorption. Annual Review of Physiology, 1983, vol. 45, no 1, p. 651-677.

²⁵ ZHANG, W. B.; ADDIS, P. B.; KRICK, T. P. Quantification of 5 -Cholestane-3 , 5, 6 -triol and Other Cholesterol Oxidation Products in Fast Food French Fried Potatoes. En Journal of food science, 1991, vol. 56, no 3, p. 716-718.

²⁶ RAO, V. Kesava, et al. Effect of cooking and storage on lipid oxidation and development of cholesterol oxidation products in water buffalo meat. En: Meat science, 1996, vol. 43, no 2, p. 179-185.

Figura 3: Principales Oxidos de Colesterol



Fuente: Valenzuela A. (2002)²⁷

²⁷ VALENZUELA, Alfonso, et al. Óxidos del colesterol (oxisteroles): factores que condicionan su formación, efectos biológicos, y su presencia en los alimentos. En: Revista chilena de nutrición, 2002, vol. 29, no 2, p. 116-124.

Los productos de oxidación de colesterol poseen estructuras semejantes al colesterol, presentan grupos funcionales como hidroxilos, cetona o epóxido adicionado al núcleo esterol o a la cadena lateral de la molécula de colesterol. Estos compuestos pueden entrar en circulación sanguínea como contaminante²⁸.

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 nativas²⁹

El conocimiento sobre los oxiesteroles, 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 oxiesteroles son potentes moduladores de la 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 oxiesteroles ejercen sobre la expresión de ciertos genes in vitro³⁰.

2.1.4 Síntesis de óxidos del colesterol

Según se aprecia en la figura, la molécula de colesterol está compuesta por 4 anillos (A, B, C y D). El colesterol es un derivado del ciclopentanoperhidrofenantreno. Esta nomenclatura se debe a que los anillos A, B y C corresponden a la estructura del fenantreno y el anillo D es un ciclopentano. Los hidrógenos en las posiciones 10 y 13 son sustituidos por grupos metilo y en la posición 17 por un grupo R (C₈H₁₇), el cual forma una cadena lateral³¹.

El doble enlace hace que C-4 del anillo A y C-7 del anillo B permanezcan en el plano. Se podría esperar que ambas posiciones tengan igual oportunidad al ataque oxidativo, sin embargo, C-7 es una posición común a este ataque. El ataque rara vez ocurre en C-4 por el efecto de apantallamiento del grupo hidroxilo

²⁸ GIL, M. D., et al. Oxidación del colesterol en carne y derivados: Factores que determinan su formación. En Anales de Veterinaria de Murcia. 2004. p. 21-34.

²⁹ KRITCHEVSKY, D. Cholesterol vehicle in experimental atherosclerosis. A brief review with special reference to peanut oil. En Archives of pathology & laboratory medicine, 1988, vol. 112, no 10, p. 1041-1044.

³⁰ MOREL D. (1996). *op, cit.*, p. 495-506

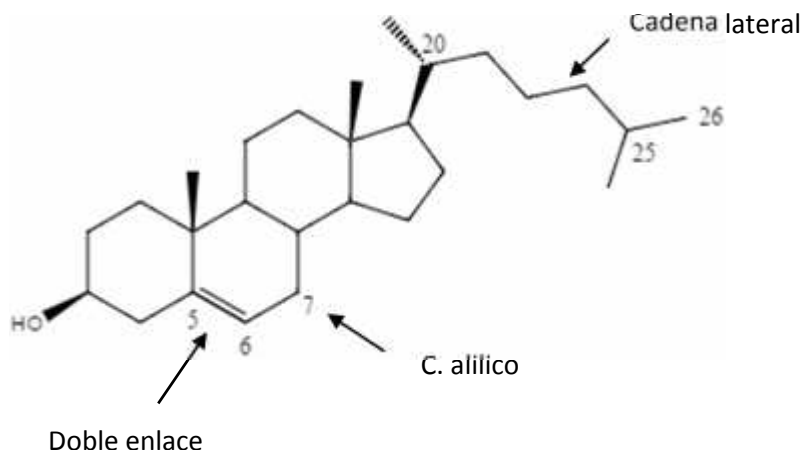
³¹ VELARDE E. (2006). *op, cit.*, p. 11-20.

en C-3 y el triálquil en C-5³². La presencia de un grupo hidroxilo en la posición C-3 le confiere al anillo A, una elevada estabilidad y una mayor resistencia a los procesos de auto-oxidación, por lo que los oxiesteroles sintetizados por esta vía representan una fracción minoritaria respecto del perfil de COPs formados. En cuanto a la cadena lateral alifática, C-20 y C-25 son carbonos terciarios y, por consiguiente, más susceptibles al ataque oxidativo que los otros carbonos³³.

Los compuestos predominantes son los originados a partir de la oxidación en el C-7 y son: 7-hidroxicolesterol, 7-hidroxicolesterol, y 7-cetocolesterol³⁴.

En la oxidación de los carbonos terciarios C-20 y C-25 de la cadena lateral se originan 20-hidroxicolesterol y 25-hidroxicolesterol respectivamente³⁵. En la figura 4 se aprecian los puntos susceptibles de oxidación en la molécula del colesterol.

Figura 4: Posiciones de la Molécula de Colesterol Susceptibles al Ataque Oxidativo



Fuente: Smith L. (1987)³⁶

³² MAERKER, G.; BUNICK, F. J. Cholesterol oxides II. Measurement of the 5, 6-epoxides during cholesterol oxidation in aqueous dispersions. En: Journal of the American Oil Chemists' Society, 1986, vol. 63, no 6, p. 771-777.

³³ SMITH, Leland L. Cholesterol autoxidation 1981-1986. En: Chemistry and Physics of Lipids, 1987, vol. 44, no 2-4, p. 87-125.

³⁴ VELARDE E. (2006). op, cit., p. 11-20.

³⁵ Ibid., p. 12

³⁶ SMITH L. (1987). op, cit., p. 87-125

Alimentos con alto contenido de colesterol, como: huevos, leche y derivados, carne y productos cárnicos procesados, cuando se exponen al ambiente, temperaturas altas, luz, radiación o combinación de estos factores durante su almacenamiento o procesamiento, pueden representar fuentes importantes de óxidos de colesterol en la dieta³⁷.

El principal origen de los COPs son los aceites y los alimentos fritos en ellos, como las patatas y comidas rápidas fritas. Sobre todo aquellos aceites ricos en ácidos grasos polinsaturados los que presentan mayor inestabilidad frente al calentamiento, y en los que se produce, por tanto, mayor cantidad de productos de oxidación³⁸.

En la siguiente tabla se aprecian los principales Oxidos de colesterol formados por diferentes tratamientos en productos cárnicos.

Tabla 2: Formación de productos de oxidación del colesterol en alimentos afectados por varios tratamientos

ALIMENTO	TRATAMIENTO	COPs FORMADOS	CANTIDAD (partes por millón) mg/Kg
PRODUCTOS CARNICOS:			
Carne de ternera	Radiado	5,6 -ep, 5,6 -ep, 4colesteno-3ona, 4,6colesta-dieno-3-ona.	2.7-183
Carne de cerdo	Almacenada con aire	5,6 -ep, 7-ceto, 7 -OH, triol.	12.5-259.8
Tocino	Frito	5,6 -ep, 7-ceto, 7 -OH, 25-OH	0.2-0.5
Pollo	Crudo	5,6- ep, 5,6 -ep, 7-ceto.	5.8-12.9

Fuente: Soto I. (2004)³⁹

³⁷ GIL, M. D. (2004). *op, cit.*, p. 21-34

³⁸ MISSLER, S. R.; WASILCHUK, B. A.; MERRITT, C. Separation and identification of cholesterol oxidation products in dried egg preparations. En Journal of Food Science, 1985, vol. 50, no 3, p. 595-598.

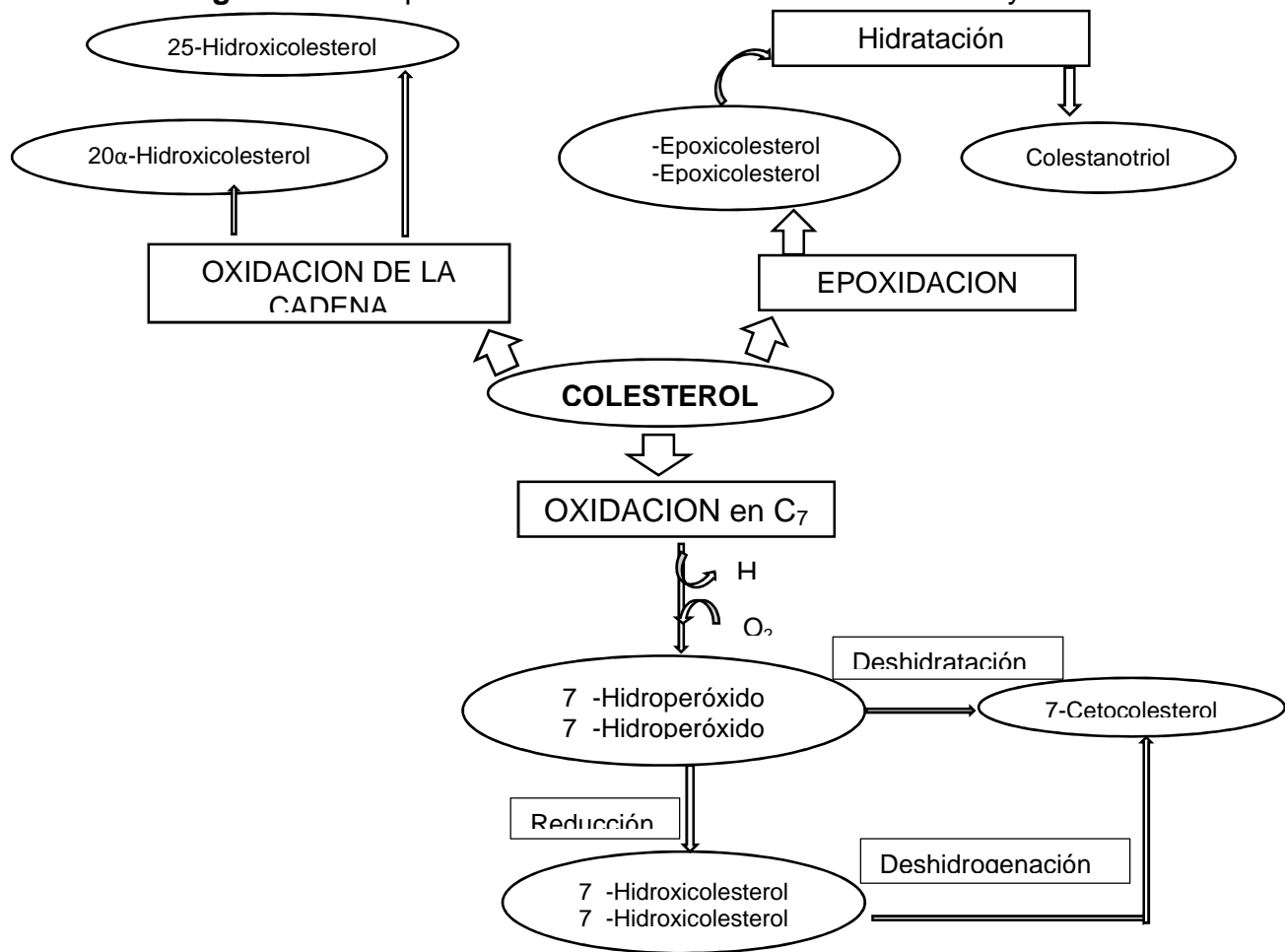
³⁹ SOTO, Ida, et al. Los óxidos de colesterol en los alimentos y su efecto en la salud. En: Ciencia (2004). P. 66-75.

La cadena de reacciones mediada por radicales lipídicos ha sido considerada como la principal vía de formación de oxiesteroles en carne y derivados cárnicos. La susceptibilidad de oxidación del colesterol ha sido reconocida, e investigado durante décadas, sin embargo, las vías de formación de algunos COPs no han sido completamente aclaradas.

La oxidación de los esteroides sigue los mismos patrones de oxidación de los lípidos tales como autooxidación, fotooxidación u oxidación enzimática, produciendo los hidroperóxidos correspondientes⁴⁰.

⁴⁰ LARKESON, B.; DUTTA, P. C.; HANSSON, I. Effects of frying and storage on cholesterol oxidation in minced meat products. En: Journal of the American Oil Chemists' Society, 2000, vol. 77, no 6, p. 675-680.

Figura 5: Principales rutas de Síntesis de COPs en Carne y Derivados.



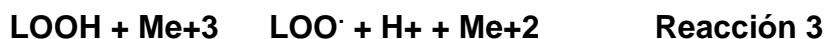
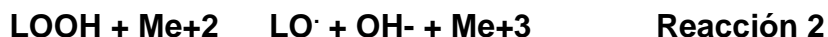
Fuente: GIL, M. D. (2004)⁴¹.

⁴¹ GIL, M. D. (2004). *op. cit.*, p. 21-34

La principal ruta de formación de COPs se inicia tras la extracción de un hidrógeno en el C7 mediante una reacción autocatalítica con oxígeno molecular formando los hidroperóxidos correspondientes a través de una serie de reacciones que implican radicales libres. Los lípidos insaturados (LH) pierden un radical (H·) de la posición 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.



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:



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



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^{42,43}.



Estos productos primarios de la oxidación del colesterol son altamente inestables, por lo que tienden a sufrir diversos tipos de reacciones que originan una amplia

⁴² TERRASA A. Alternativas tecnológicas aplicables al desarrollo y conservación de productos cárnicos cocidos (patés) durante el almacenamiento refrigerado. tesis de maestría. En: Universidad de la plata. Facultad de ciencias veterinarias. Argentina (2012). p. 13-16.

⁴³ NIELSEN, J. H.; OLSEN, C. E.; SKIBSTED, L. H. Cholesterol oxidation in a heterogeneous system initiated by water-soluble radicals. En: Food chemistry, 1996, vol. 56, no 1, p. 33-37.

gama de oxisteroles⁴⁴. La reducción de ambos isómeros determina la síntesis de 7 α - y 7 β -hidroxicolesterol, mientras que su deshidratación induce la aparición de la forma 7-cetocollesterol. Estos tres compuestos derivados del anillo B han sido identificados como los oxisteroles mayoritarios en distintos tipos de carne y productos cárnicos⁴⁵.

Cuando la carne es sometida a la acción de factores pro oxidantes (especialmente a altas temperaturas) se ponen en marcha otras rutas de oxidación del colesterol. Las reacciones de epoxidación en el anillo B dan lugar a la formación de 5 α ,6 α - y 5 α ,6 β -epóxidos que, por hidratación posterior, inducen la aparición de colestanoetriol⁴⁶.

Cuando las reacciones de auto oxidación se inician en la cadena lateral se originan 20 α , 24S, 25 y 26-hidroperóxidos la mayor parte de los cuales por descomposición térmica, dan lugar a sus respectivos alcoholes: 20 α , 25 y 26-hidroxicolesterol. En cualquier caso, la síntesis de este tipo de oxisteroles requiere de la aplicación de condiciones severas de calentamiento⁴⁷.

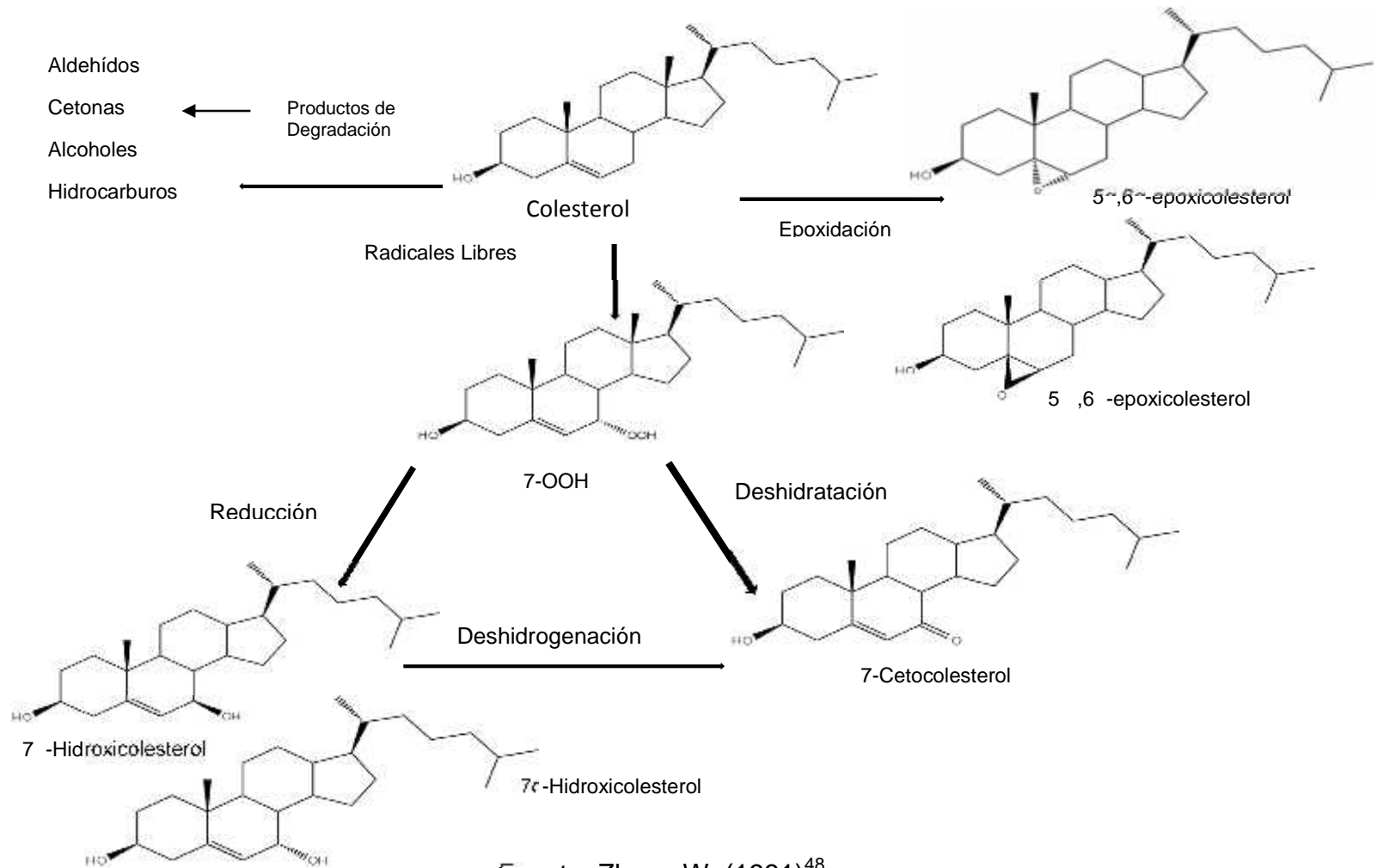
⁴⁴ SMITH, Leland L.; TENG, Jon I. Sterol metabolism. XXIX. Mechanism of microsomal lipid peroxidation in rat liver. En: Journal of the American Chemical Society, 1974, vol. 96, no 8, p. 2640-2641.

⁴⁵ GIL, M. D. (2004). op, cit., p. 21-34

⁴⁶ ZANARDI, E., et al. Oxidative stability of lipids and cholesterol in salame Milano, coppa and Parma ham: dietary supplementation with vitamin E and oleic acid. En: Meat Science, 2000, vol. 55, no 2, p. 169-175.

⁴⁷ PANIANGVAIT, P. (1995). op, cit., p. 1159-1174.

Figura 6: Productos de la Auto-oxidación del Colesterol



Fuente: Zhang W. (1991)⁴⁸

⁴⁸ ZHANG, W. et. al. (1991). Op,cit. p. 716-718.

Con respecto a la fotooxidación, 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 más activa,^{49,50,51}. 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-hidroxicolesterol y la otra parte del hidroperóxido 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-epoxicolesoles y 7 β -hidroxicolesterol pueden convertirse adicionalmente en 6-cetocolestanol y 7-cetocolesterol respectivamente; este resultado implica que tanto 7-Hidroxicolesterol y 7-cetocolesterol pueden ser convertible en función de las condiciones de iluminación^{52,53}.

⁴⁹ Ibid., p. 717

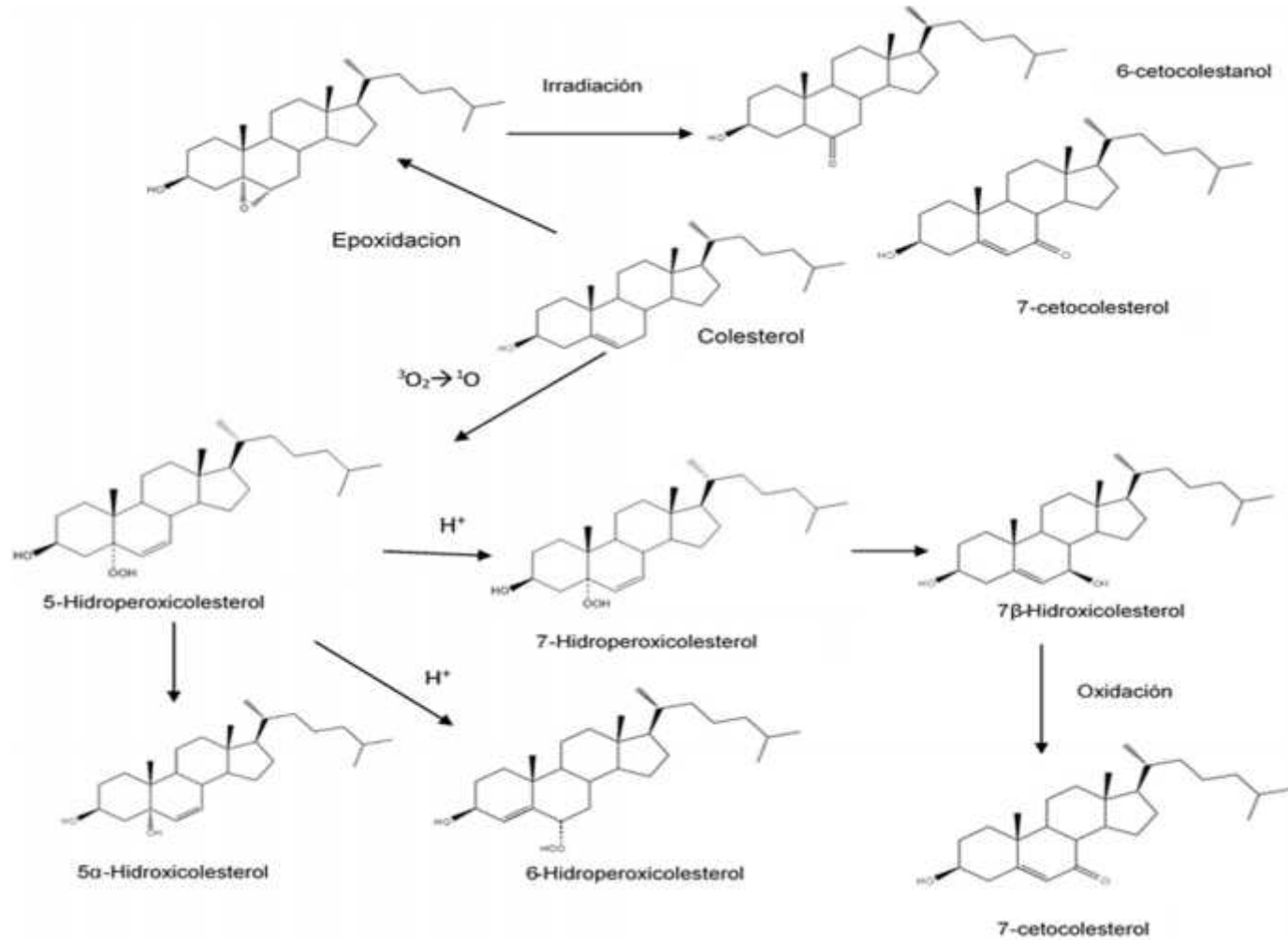
⁵⁰ UBHAYASEKERA, Kumari. Cholesterol oxidation products—analytical methods and levels in sweets containing heated butter oil. Tesis Doctoral. En: Lantbruks university. Suecia (2004). p. 5-8.

⁵¹ KULIG, Martin J.; SMITH, Leland L. Sterol metabolism. XXV. Cholesterol oxidation by singlet molecular oxygen. En: The Journal of organic chemistry, 1973, vol. 38, no 20, p. 3639-3642.

⁵² HWANG, K. T.; MAERKER, G. Quantitation of cholesterol oxidation products in unirradiated and irradiated meats. En: Journal of the American Oil Chemists' Society, 1993, vol. 70, no 4, p. 371-375.

⁵³ NIELSEN, J. et. al. (1996). Op, cit. p. 33-37.

Figura 7: Fotooxidación del Colesterol



Fuente: Ubhayasekera K. (2004)⁵⁴

⁵⁴ UBHAYASEKERA, K.et. al. (2004). Op,cit. p.7.

Con respecto a la oxidación enzimática, algunas investigaciones muestran que la conversión de los 5 -hidroperóxicolesterol en 7 -hidroperoxicolesterol, la epimerización de 7 -hidroperoxicolesterol en 7 -hidroperoxicolesterol y la formación de los epímeros del 7-Hidroxicolesterol desde los correspondientes hidroperóxidos, tiene lugar mediante reacciones enzimáticas; las cuales, deben ser estudiadas en mayor extensión, debido al hecho de que estos productos se pueden formar también mediante reacciones no enzimáticas. Las reacciones enzimáticas y no enzimáticas pueden ocurrir por separado o simultáneamente durante la producción, procesado, distribución y almacenamiento de los alimentos⁵⁵.

2.1.5. Implicaciones sobre la salud de los óxidos de colesterol

Existen diversas referencias sobre los efectos nocivos que tienen los óxidos de colesterol en la salud humana, entre los efectos reportados se encuentra: la citotoxicidad, aterosclerosis y alteraciones histopatológicas⁵⁶.

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*⁵⁷. En diferentes estudios (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 reductasa⁵⁸, punto clave en la regulación de la síntesis del colesterol. Esta inhibición impide a la célula sintetizar su propio colesterol, produciéndose alteraciones a nivel de las membranas plasmática e intracelular, afectando su fluidez y funciones y produciendo finalmente la muerte celular.⁵⁹

⁵⁵ NIELSEN, J.et. al. (1996). Op,cit. p. 33-37.

⁵⁶ PENG, S.et. al. (1984). *Op. cit* 117-154.

⁵⁷ VALENZUELA, A.et. al. (2002). Op,cit. p. 116-124.

⁵⁸ GIBBONS, Geoffrey F. The role of cytochrome P450 in the regulation of cholesterol biosynthesis. En: Lipids, 2002, vol. 37, no 12, p. 1163-1170.

⁵⁹ ROGERS, Adrienne E. Diet and toxicity of chemicals. En: The Journal of Nutritional Biochemistry, 1991, vol. 2, no 11, p. 579-593.

Se ha demostrado, además, que los oxisteroles inhiben la síntesis del ADN, lo cual detiene el ciclo celular interfiriendo la división y proliferación de células en cultivo⁶⁰.

Otro efecto biológico de los oxisteroles es la inducción de la agregación de la trombina, lo cual podría explicar el efecto trombótico observado para estos productos de oxidación⁶¹. Además, en estudios *in vitro* se ha observado efectos mutagénicos y procarcinogénicos para algunos oxisteroles⁶². Cabe destacar que la absorción y reabsorción intestinal de los oxisteroles en humanos es similar a la del colesterol⁶³.

El contenido de peróxidos y el metabolismo de los quilomicrones son afectados por el estado oxidado de las grasas de la dieta. Así, la grasa oxidada que ingresa a la circulación vía quilomicrones da lugar a peróxidos séricos en cantidades elevadas, disminuyendo la actividad de hidrólisis de la enzima lipoproteína lipasa, provocando así el depósito de lípidos en las arterias⁶⁴.

Estudios *in vitro* identifican al 25-hidroxicolesterol y al 7 -hidroperoxicolesterol como los más tóxicos. Investigaciones *in vivo* muestran al colestanolol, y al 25-hidroxicolesterol como los más dañinos⁶⁵.

2.1.6. Colesterol en carne de pollo

La carne de pollo es uno de los alimentos de mayor consumo en el mundo así lo reporta un estudio realizado por la FAO, donde el consumo de carne avícola ha subido de 11 kg por persona en el año 2000 a 14.4 kg en el año 2011; así mismo reportan el consumo de carne avícola en Colombia incrementando desde el año

⁶⁰ ASTRUC, M., et al. DNA and cholesterol biosynthesis in synchronized embryonic rat fibroblasts: II. Effects of sterol biosynthesis inhibitors on cell division. En: Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 1983, vol. 763, no 1, p. 11-18.

⁶¹ SHIMADA, H., et al. Rapid modulation of platelet aggregation in plasma by oxygenated sterols. En: Journal of applied biochemistry, 1984, vol. 6, no 3, p. 151-155.

⁶² ANSARI, G. A. S., et al. Further investigations of mutagenic cholesterol preparations. En: Food and Chemical Toxicology, 1982, vol. 20, no 1, p. 35-41.

⁶³ EMANUEL, H. A., et al. Plasma cholesterol oxidation products (oxysterols) in human subjects fed a meal rich in oxysterols. En: Journal of food science, 1991, vol. 56, no 3, p. 843-847.

⁶⁴ STAPRANS, Ilona, et al. Oxidized cholesterol in the diet accelerates the development of aortic atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. En: Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 1998, vol. 18, no 6, p. 977-983.

⁶⁵ SOTO, I. et. al. (2004). Op,cit. p. 66-75.

2000 con 13.5 Kg por persona a 23.9 Kg por persona en el año 2011⁶⁶. Las principales razones de su preferencia radican en su fácil acceso y valor nutricional.

La carne de pollo contiene en promedio, un 20% de proteínas al igual que la carne de vaca. Es más bajo en grasas, ya que posee alrededor de un 9% y no contiene cantidades apreciables de carbohidratos. Dentro de las grasas, posee grasas saturadas, pero al mismo tiempo, aporta ácidos grasos mono insaturados y poliinsaturados en menor cantidad. En el pollo destaca su aporte proteico, así como su contenido de ácido fólico y vitaminas B3, ideales para el correcto funcionamiento cerebral. Asimismo, posee elevadas cantidades de hierro, zinc, fósforo y potasio⁶⁷.

La cantidad de grasa en las aves depende de la edad, sexo y la especie. También la parte de la cual se tome la muestra de grasa es significativa pues a diferencia de la res y el cerdo la mayoría de la grasa se encuentra por debajo de la piel y no distribuida en los tejidos. La pechuga de pollo contiene tan solo 1.3%⁶⁸. La cantidad de colesterol en la carne de pollo es baja, por cada 100 gramos de carne solo se tienen miligramos de colesterol y varía según la pieza: la pechuga de pollo contiene 64 mg de colesterol mientras que la pierna contiene 91 mg de colesterol⁶⁹.

Figura 8: Cortes de la Carne de Pollo



⁶⁶ EL SITIO AVICOLA. Tendencias Avícolas Mundiales 2016: Crece el consumo de pollo en América. [En línea]. <http://www.elsitioavicola.com/articulos/2871/tendencias-avacolas-mundiales-2016-crece-el-consumo-de-pollo-en-amarica/>. [citado en 5 de Diciembre de 2016].

⁶⁷ GOTTAU G. Op,cit.

⁶⁸ CARVAJAL, S. G. Valor nutricional de la carne de res, cerdo y pollo. Corporación de fomento ganadero, 2001.

⁶⁹ USA Poultry & Egg Export Council. Contenido Nutricional de Carne de Pollo (sin piel) 1 por cada 100g de producto. [en línea]. [Mhttp://usapeec.org.mx/nutricion/informacion_nutricional/pollo.html](http://usapeec.org.mx/nutricion/informacion_nutricional/pollo.html). /. [citado en 2 de Diciembre de 2016].

Fuente: Deperu.com (2016)⁷⁰

⁷⁰ DEPERU.COM. Cortes de Carnes. [en Línea]. <http://www.deperu.com/carnes/carne-pollo.php>. /. [citado en 2 de Diciembre de 2016].

2.1.7 Técnicas Analíticas para Análisis de COPs

2.1.7.1. Extracción en Fase Sólida

La cromatografía de adsorción se fundamenta en 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 o no 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 opuestas⁷¹. Una de las principales aplicaciones de la cromatografía de adsorción es la extracción en fase sólida (del inglés SPE). La SPE utiliza cartuchos de polipropileno rellenos con un adsorbente que puede ser un sustrato de sílice enlazado a un compuesto orgánico. Los cartuchos más usados son de gel de sílice modificado con C18, C8, etilo, propilo, enlazados químicamente. Inicialmente la columna se acondiciona haciéndose pasar volúmenes de solventes de diferentes polaridades en orden creciente, hasta terminar en la matriz en la cual están los analitos.

Una vez acondicionada la columna, se aplica la muestra, los analitos presentes son retenidos por el adsorbente debido a las fuerzas atractivas que se generan. Seguidamente, se lava el adsorbente con un solvente adecuado, que no eluya el analito, para eliminar algunas interferencias que hayan quedado retenidas en la columna; por último, la elución de los analitos se realiza con un solvente o una mezcla de solventes de polaridad similar.

2.1.7.2 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

⁷¹ SKOOG D., HOLLER F., NIEMAN T. Principios de análisis instrumental, quinta edición, Ed. McGraw-Hill (2007), p.810-811

columna cromatográfica, se clasifica en: cromatografía de adsorción, intercambio iónico y exclusión molecular según la naturaleza de la fase estacionaria

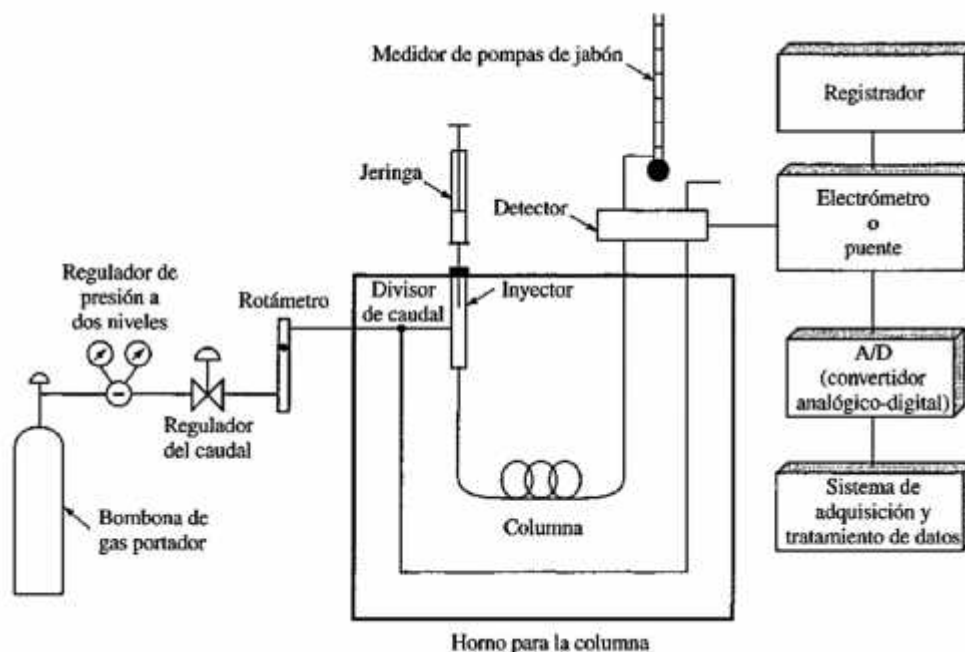
En HPLC el compuesto pasa por la columna cromatográfica a través de la fase estacionaria mediante el bombeo de líquido (fase móvil) a alta presión a través de la columna. La muestra a analizar es introducida en pequeñas cantidades y sus componentes se retrasan diferencialmente dependiendo de las interacciones 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, del tipo y composición de la fase estacionaria y de la fase móvil empleada para la separación. La presión en la cromatografía líquida de alta eficiencia incrementa la velocidad lineal de los compuestos dentro de la columna reduciendo su difusión, con ello se logra una mayor resolución. Los disolventes más utilizados en cromatografía líquida de alta eficiencia son: Agua, Acetonitrilo, Metanol e Isopropanol. El agua puede contener tampones, sales, o compuestos que regulan o modifican el pH, los cuales ayudan a la separación de los compuestos⁷².

2.1.7.3 Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas

La cromatografía de gases es una técnica analítica que permite separar mezclas de compuestos fácilmente volatilizables y térmicamente estables en sus componentes individuales. Este método se basa en la distribución de las moléculas en una fase estacionaria (columna) y su flujo mediante una fase móvil que es un gas portador. La fase estacionaria retiene los compuestos afines a ella según su polaridad. Entre las principales columnas capilares apolares se encuentran las constituidas por polidimetilsiloxano y PDMS-fenil Arileno.

⁷² bid., p. 785

Figura 9: Esquema de un Cromatografo de Gases



Fuente: Skoog, D. et al. (2007)⁷³.

La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) es una técnica muy empleada para determinar compuestos orgánicos a nivel de trazas, es capaz de obtener registros tridimensionales, es decir para cada tiempo de retención se obtiene un espectro de masas de las moléculas que han eluido de la fase estacionaria⁷⁴.

La espectrometría de masas se basa en la obtención de iones a partir de moléculas orgánicas en fase gaseosa, dichos iones son separados de acuerdo a su relación de masa carga (m/z). Este proceso no es reversible, debido a que los iones no se pueden recuperar de la muestra, es decir, es un método destructivo. La introducción de la muestra a una cámara de ionización puede ser directa a través de una sonda (muestra sólida) o indirecta (mediante un sistema de separación, que puede ser cromatografía de gases, de líquidos y electroforesis capilar). A la salida de la fuente de iones, se encuentra el analizador de masas,

⁷³ Ibid., p. 762

⁷⁴ Ibid., p. 778

encargado de separar los diferentes iones producidos con base en la relación m/z y luego siguen a un detector conectado a un registrador⁷⁵.

2.1.8 Técnicas Cromatográficas Aplicadas Para el Análisis de COPs

2.1.8.1. Cromatografía Líquida 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 análisis⁷⁶.

Es por ello que la Técnica de HPLC es uno de los mejores métodos 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 líquida de alta eficiencia (HPLC) es un sistema analítico muy versátil debido a su capacidad de actuar con muchos sistemas de detectores, facilidad en el uso de los modos de separación (fase normal y fase reversa). Asimismo, brinda la posibilidad de emplear diferentes tipos y dimensiones de columnas, composición de fase móvil, lo cual da lugar a su identificación y cuantificación⁷⁷.

⁷⁵ ZULUAGA F., INSUASTY B., YATES B. Análisis Orgánico Clásico y Espectral, Ed. Universidad del Valle (2000), p 195-200.

⁷⁶ RODRIGUEZ-ESTRADA, M. T.; CABONI, M. F. Determination of cholesterol oxidation products by high-performance liquid chromatography. *En*: GUARDIOLA Francesc, et al. Cholesterol and Phytosterol Oxidation Products: Analysis, Occurrence, and Biological Effects. Illinois: AOCS Press Champaign, 2002. p. 71-100.

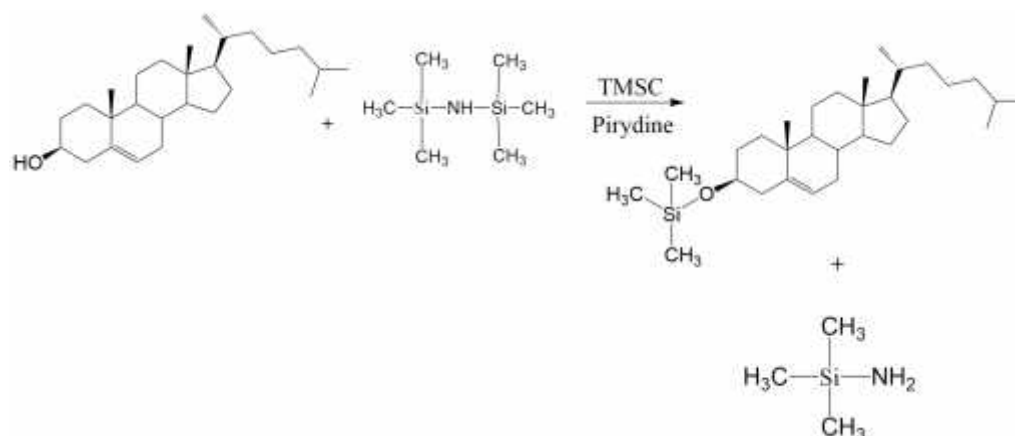
⁷⁷ MONTEZUMA A.; ALVAREZ W. Formación de óxidos de Colesterol en el proceso de Preparación del Frito Pastuso. Trabajo de Grado (Químico). Universidad de Nariño. Facultad de ciencias Exactas y Naturales. Departamento de Química. Colombia (2014). p. 39-40.

2.1.8.2 Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas Aplicada para Análisis de COPs

Esta técnica permite detectar los óxidos de colesterol (COPs), debido a su alta eficacia para llevar a cabo su separación y detección. Los sistemas de inyección "Split/splitless" permiten mejorar el análisis de este tipo de compuestos, sin embargo, se requiere aplicar una reacción de derivatización a los COPs, con reactivos agresivos como el Tri-Sil (HDMS:TMCS: Piridina)⁷⁸.

La siguiente figura, esquematiza la reacción de derivatización empleada para el análisis de COPs por GC-MS

Figura 10: Reacción de derivatización para análisis por GC-MS:



Fuente: ORATA, F. (2012)⁷⁹

⁷⁸ LOZADA C. (2013). op, cit., p.78.

⁷⁹ ORATA, Francis. Derivatization reactions and reagents for gas chromatography analysis. En: Advanced Gas Chromatography-Progress in Agricultural, Biomedical and Industrial Applications. InTech, 2012.

Tabla 3: Análisis de óxidos de Colesterol (COPs) por diferentes técnicas Cromatográficas en diferentes matrices

Muestra	COPs analizados	Preparación de muestra	Técnicas de análisis	Condiciones cromatograficas
Carne de Pollo	-epoxido 7 -hidroxicolesterol 7 - hidroxicolesterol 7-cetocolesterol	Extracción con lixiviación. Limpieza de la muestra por CC de silica. Derivatizacion con reactivo Piridina:TMS	GC ⁸⁰	<ul style="list-style-type: none"> • Columna: Supelcowax (30m x0.32mm x0.32µm) • Detector: FID a 300°C • Modo de separación en programación de temperatura • Fase móvil: He UAP a presión constante: 14psi.
Carne de pollo	20 -Hidroxicolesterol 25-Hidroxicolesterol 7-cetocolesterol 7 -Hidroxicolesterol 24S- Hidroxicolesterol	Extraccion mediante Saponificacion en frio con EtOH/KOH	HPLC-UV ⁸¹ HPLC-MS	<ul style="list-style-type: none"> • Columna: Nova pak CN (300mm x 3.9 mm x 4µm). • Detector: UV-Vis 210nm y MS en modo de ionización APCI. • Modo de separación Isocratico. • Fase Movil: Hex:IPA (97:3) • Flujo: 1 mL/min

⁸⁰ LEE, J. I., et al. Formation of cholesterol oxides in irradiated raw and cooked chicken meat during storage. En: Poultry science, 2001, vol. 80, n°1, p. 105-108.

⁸¹ MARIUTTI, Lilian RB; NOGUEIRA, Gislaine C.; BRAGAGNOLO, Neura. Optimization and validation of analytical conditions for cholesterol and cholesterol oxides extraction in chicken meat using response surface methodology. En: Journal of agricultural and food chemistry, 2008, vol. 56, no 9, p. 2913-2918.

Carne de pollo	25-Hidroxicolesterol 7-cetocolesterol 7 - hidroxicolesterol 7 - hidroxicolesterol	Extraccion con CHCl ₃ /MeOH por el método de Folch	HPLC ⁸²	<ul style="list-style-type: none"> • Columna: CN-bonded (250mm x 4mm x 5µm). • Detector: UV-Vis 206 nm y 233 nm • Modo de separación Isocratico. • Fase Movil: Hex:IPA (97:3) • Flujo 1 mL/min
Carne de Pollo	7-cetocolesterol 7 -Hidroxicolesterol Epoxicolesterol	Extraccion con CHCl ₃ /MeOH por el método de Folch	HPLC ⁸³	<ul style="list-style-type: none"> • Columna: Nova pak CN (300mm x 3.9mm x 4 µm) • Detector: DAD a 210nm • Modo de Separacion: isocratico • Fase Movil: Hex:IPA (96:4) • Flujo: 1mL/min
Carne de Pescado	22S-Hidroxicolesterol 24S- Hidroxicolesterol 25R-Hidroxicolesterol	Extraccion mediante Saponificacion en frio utilizando KOH/EtOH 50 %.	HPLC ⁸⁴	<ul style="list-style-type: none"> • Columna: Nova PAK CN (300mm x 3.9mm x 4µm) • Detector: UV-Vis y RI • Modo de Separacion: isocratico • Fase Movil: Hex:IPA (97:3)

⁸² SAMPAIO, G. R., et al. Effect of natural antioxidant combinations on lipid oxidation in cooked chicken meat during refrigerated storage. En: Food Chemistry, 2012, vol. 135, n° 3, p. 1383-1390.

⁸³ VELARDE E. (2006). op, cit., p. 14-16.

⁸⁴ SALDANHA, Tatiana, et al. HPLC separation and determination of 12 cholesterol oxidation products in fish: comparative study of RI, UV, and APCI-MS detectors. En: Journal of agricultural and food chemistry, 2006, vol. 54, no 12, p. 4107-4113.

				<ul style="list-style-type: none"> • Flujo: 1mL/min
Leche	20-Hidroxicolesterol 7-cetocolesterol 25-Hidroxicolestrol 5,6 -epoxicolsterol	Extracción líquido-líquido con IPA/Hex. Extracción SPE con cartuchos de Amino Propil.	HPLC ⁸⁵ GC-MS	HPLC: <ul style="list-style-type: none"> • Columna: Eclipse Plus C18 (100mm x 2.1mm x 3.5 µm) • Detector: UV-Vis a 230nm • Modo de Separacion: Gradiente • Fase Movil:ACN:H₂O • Flujo 0.3 mL/min. GC-MS: <ul style="list-style-type: none"> • Columna: HP-5MS (30m x 0.25mm x 0.25µm) • Detector: MSD a 280°C • Modo de Separacion: en programación de Temperatura • Fase Movil: He UAP • Flujo: 1.2mL/min

⁸⁵ LEE, Jin Joo; MYUNG, Seung-Woon. Simultaneous Analysis of Cholesterol Oxidation Products (COPs) in Powdered Milk Using HPLC/UV-Vis. En: Bulletin of the Korean Chemical Society, 2013, vol. 34, n° 9, p. 2787-2794.

Carne de Cerdo	7-cetocolesterol 25-Hidroxicolesterol	Extracción por lixiviación y limpieza de muestra por SPE de silica	HPLC ⁸⁶	<ul style="list-style-type: none"> • Columna: C8 Hypersil Gold, Thermo Scientific. (150mm x 4.6mm x 3.5µm) • Detector:PDA a 205nm y 238nm • Modo de separación: Gradiente • Fase móvil:ACN:H₂O • Flujo:1.25 mL/min
Carne de Cerdo	20 -Hidroxicolesterol 25-Hidroxicolesterol 24-Hidroxicolesterol	Extraccion mediante método de Folch y saponificación en frio	HPLC ⁸⁷	<ul style="list-style-type: none"> • Columna: Nova pak CN (300mm x 3.9mm x 4µm) • Detector: DAD (200-400 nm) • Modo de separación: Isocratica • Fase móvil:Hex:IPA (96:4) • Flujo móvil 1mL/min

⁸⁶ LOZADA-CASTRO, Juan José, et al. Determinación de la formación de óxidos de colesterol en el proceso de preparación de frito pastuso usando como técnica de análisis HPLC. En: Universidad y Salud, 2015, vol. 17, no 2, p. 177-191.

⁸⁷ SOUZA, Vera Lúcia Ferreira de; SILVA, Rui Sérgio S. Dietary vitamin E supplementation on cholesterol and cholesterol oxides of pig meat and cooked ham. En: Brazilian Archives of Biology and Technology, 2006, vol. 49, n° 2, p. 197-205.

2.1.9. Diseño experimental

El diseño experimental se define como una serie de pruebas que caracterizan los factores X_i (variables independientes de entrada controlables) que tengan mayor influencia en un ensayo, de esta manera se evalúan las variaciones en los factores que generen una respuesta cuantitativa. Este proceso se realiza con el fin de minimizar el efecto de las variables no controlables Z_{io} covariables y así minimizar la variabilidad de las respuestas⁸⁸.

Un diseño experimental presenta dos fases principales:

-Caracterización de un proceso: en donde se determinan los rangos de las variables controlables que más influyan en los factores de respuesta y así minimizar el efecto de las covariables.

-Optimización de un proceso: en donde se determinan los niveles de los factores caracterizados que dan una respuesta óptima⁸⁹.

2.1.9.1. Tipos de diseño experimental

Para elegir el tipo de diseño experimental hay que tener en cuenta varios factores entre los que se encuentran el objetivo del experimento, el número de factores a controlar, los niveles que se someterán en cada factor, los efectos esperados, entre otros⁹⁰.

Los experimentos se clasifican en dos tipos:

Experimento absoluto: centra su interés en la estimación y las propiedades físicas de la población estudiada, la selección de tratamientos se realiza mediante procesos aleatorios.

⁸⁸ BARTLETT M. Properties of Sufficiency and Statistical Tests. En: Proceedings of the Royal Society of London (1937). vol. 160, p. 268-282.

⁸⁹ ARTURO F. Estudio Químico de los Alcaloides Presentes en las Hojas de Yerbamora (*solanum nigrum* L.), Originaria de los Municipios de Pasto y Chachagüí. Trabajo de Grado (Químico). En: Universidad de Nariño. Facultad de ciencias Exactas y Naturales. Departamento de Química. Colombia (2017). p. 44-46.

⁹⁰ ANSCOMBE F. The Validity of Comparative Experiments. En: Journal Royal of the Statistical Society (1947). vol. 61, p.181 -211.

Experimento comparativo: Los tratamientos se comparan por sus efectos medios sobre un factor de respuesta con el fin de determinar qué tratamiento es el que más se adecúa a un factor de respuesta óptimo. Sin embargo una forma de clasificar específicamente un diseño es en función del objetivo de experimento, la estrategia de comparación y la cantidad de variables independientes, de esta manera se tienen los siguientes tipos de diseño: ⁹¹

- Comparativos (diseños al azar, diseños de bloques, etc.)
- Factoriales (2n, 3n, etc.)
- Diseños de mezclas (diseño de redes, axial, etc.)
- Robustos (Diseños ortogonales)

2.2 Validación de una Técnica Analítica

La validación es un proceso netamente experimental, efectuado mediante estudios de laboratorio, que permite evaluar o determinar la capacidad de un esquema analítico particular, cuyas características de diseño cumplen con los requerimientos metodológicos y de resultados para la aplicación analítica propuesta; que involucra el desarrollo de un protocolo e incluye la estimación de las medidas de precisión, exactitud, sensibilidad y linealidad. ⁹².

El proceso de validación analítica es importante ya que las exigencias en los diferentes campos de la industria y la investigación, requieren contar con métodos de análisis confiables que brinden resultados reproducibles ⁹³.

⁹¹ ARTURO F. (2017). op, cit., p.44.

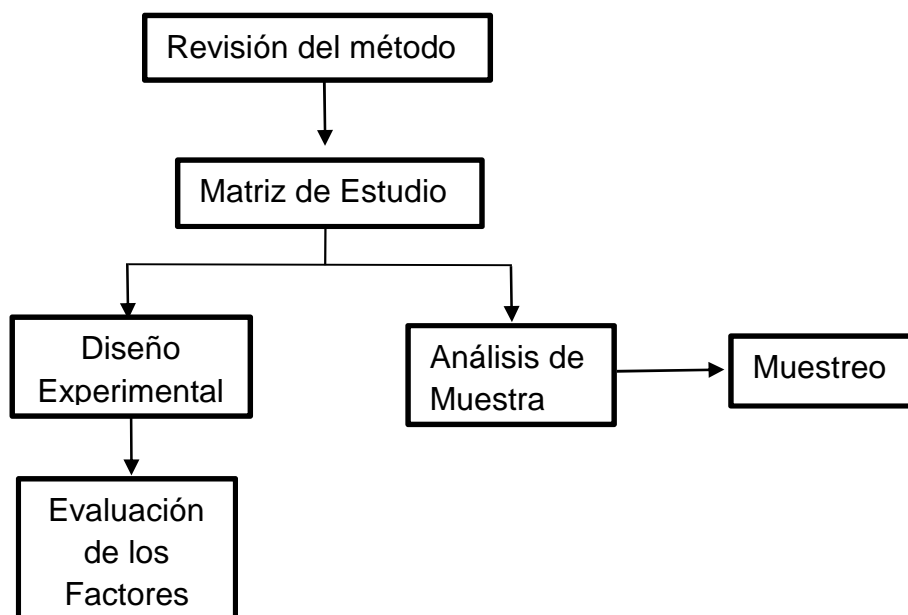
⁹² VILLAMIZAR, M. P. Estandarización de métodos analíticos usados para el análisis de agua en el laboratorio del centro de estudios e investigaciones ambientales-CEIAM. Trabajo de Grado (Químico). En: Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Colombia (2008), p. 29.

⁹³ EURACHEM WORKING GROUP, et al. The fitness for purpose of analytical methods: A laboratory guide to method validation and related topics. [en línea]. <http://www.eurachem.org/guides/pdf/valid.pdf>, 1998. [citado en 25 de Enero de 2017].

3. METODOLOGIA

El siguiente esquema ilustra los procedimientos empleados en la presente investigación.

Figura 11: Procedimiento Metodológico General



Fuente: Esta Investigación

3.1. Materiales y Reactivos

3.1.1. Descripción de Reactivos

3.1.1.1. Estándares

Nombre Común	Nombre IUPAC	N° CAS	Abreviatura
25-Hidroxicolesterol	5-Coleste-3 ,25-diol	2140-46-1	25-OH
7-Cetocolesterol	5-colesten-3 -ol-7-ona	566-28-9	7Ceto
7 -Hidroxicolesterol	5-colesten-3 ,7 -diol	566-27-8	7 -OH
Colesterol	3 -cholest-5-en-3-ol	57-88-5	

- ✓ 25-hidroxicolesterol (25-OH) Sigma E.U.A
- ✓ 7-cetocolesterol (7-Ceto) Sigma E.U.A
- ✓ 7 -hidroxicolesterol (7 -OH) Sigma E.U.A
- ✓ Colesterol Merck Alemania

3.1.1.2. Disolventes

- ✓ Acetonitrilo (ACN) ACS/HPLC Honeywell E.U.A
- ✓ Cloroformo (CHCl₃) ACS/HPLC Honeywell E.U.A
- ✓ 2-Propanol (IPA), ACS/HPLC Fisher E.U.A
- ✓ Metanol (MeOH) HPLC Fisher E.U.A
- ✓ n-Hexano HPLC Honeywell E.U.A
- ✓ Acetona ACS/HPLC Honeywell E.U.A
- ✓ Éter Etilico AR-ACS Honeywell E.U.A

3.1.1.3 Reactivos

- ✓ Sulfato de sodio. Merck Alemania
- ✓ Tri-Sil (HDMS:TMCS:Piridina)Thermo Scientific, E.U.A

• 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 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 Lozada⁹⁴, teniendo en cuenta la buena afinidad por los compuestos objetivo, baja solubilidad del solvente en agua y adecuada selectividad para los análisis por cromatografía líquida.

⁹⁴ LOZADA C. (2013). op, cit., p.149.

3.1.2. Materiales y Equipos

3.1.2.1. Materiales

3.1.2.1.1. Materiales para Preparación de Muestras

- ✓ Cartuchos de sílica para SPE de 500mg/ 6mL (Restek) E.U.A
- ✓ Cartucho de C18 para SPE de 500mg/6mL (Restek) E.U.A
- ✓ Filtros de GHP (Pall) de 4 mm y 0.45 µm
- ✓ Viales ambar de tapa rosca (Thermo Scientific)
- ✓ Manifold thermo scientific para SPE

3.1.2.1.2. Equipos

- ✓ Plancha Magnetica Velp Scientific
- ✓ Derivatizador EYELA MG-2200
- ✓ Rotaevaporador EYELA Japon
- ✓ Balanza Analítica Ohaus Pioneer
- ✓ Equipo de Humedad SEIKO SCALE

3.1.2.2. Equipos Cromatográficos

3.1.2.2.1 Cromatógrafo de Líquidos de Alta Eficiencia

Tabla 4: Especificaciones del Equipo Cromatográfico HPLC para Análisis de Colesterol y COPs-Laboratorio de Cromatografía –Universidad de Nariño

Descripción	Características
Técnica	HPLC en fase reversa
Equipo	WATERS BREEZE
Detector	PDA 2998 (190-400 nm)
Columna	C8 (150 x 4,6mm x 3,5µm) Thermo Scientific
Inyector	Rheodyne 7525 y LOOP de 20 µL

Fuente: Esta investigación

Figura 12: Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiencia, HPLC.



Fuente: Esta Investigación

Tabla 5: Especificaciones del Equipo Cromatográfico GC-MS para Análisis de Colesterol y COPs-Laboratorio de Cromatografía –Universidad de Nariño.

Descripción	Características
Técnica	GC-MS
Equipo	Shimadzu GC-MS QP2010S
Detector	MSD modo: <i>Full scan</i>
Columna	SHXRI-5MS (30m, 0,25mm x df 0,25 µm) Shimadzu.
Inyector	<i>split-splitless</i>

Fuente: Esta investigación

Figura 13: Cromatógrafo de Gases-Masas Shimadzu GC-MS QP2010.



Fuente: Esta Investigación

3.2. Desarrollo del Método

3.2.1. Montaje de la técnica por HPLC.

Las condiciones del análisis cromatográfico para la separación, identificación y cuantificación de COPs en las muestras de estudio se establecieron de acuerdo a la metodología realizada por Lozada⁹⁵. Las condiciones de análisis por HPLC-PDA son las siguientes: Columna analítica C8 (Hypersil Gold, Thermo scientific, 150 mm x 4,6 mm x 3,5 μ m), fase móvil ACN:H₂O en composición según en modo gradiente de la tabla N°6. La temperatura de la columna 30°C. La detección se realizó a 205 y 238 nm (scan 200 – 400nm). Los datos fueron adquiridos empleando el programa Empower 2 (Waters corporation E.U.A)

En la siguiente tabla se resumen los parámetros que se emplearon con la composición de fase móvil.

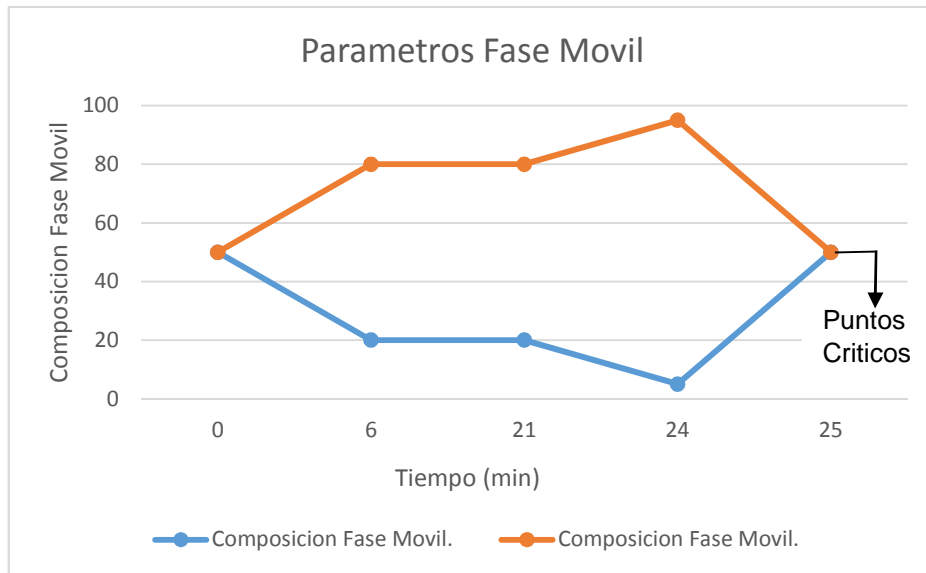
⁹⁵ Ibid., p. 129

Tabla 6: Parámetros de la fase móvil. Composición para separación de COPs

Condiciones		Composición Fase Móvil.	
Tiempo (min)	Flujo (mL/mn)	% Agua	% ACN
0	1.25	50	50
6	1.25	20	80
21	1.25	20	80
24	1.25	5	95
25	1.25	50	50

Fuente: Esta investigación

Figura 14: Parámetros Fase Móvil



Fuente: Esta investigación

Tabla 7: Parámetros de la fase móvil. Composición para la separación de Colesterol

Condiciones		Composición Fase Móvil.	
Tiempo (min)	Flujo (mL/mn)	% Agua	% ACN
0	1.25	50	50
6	1.25	10	90
14	1.25	10	90
16	1.25	5	95
17	1.25	50	50

Fuente: Esta investigación

3.3. Revisión del Método Cromatográfico.

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

3.3.1. Linealidad

Para la determinación de la linealidad se prepararon soluciones estándar de la mezcla de COPs a partir de la solución stock de 1000ppm. El rango de concentración fue 0,1 a 100 ppm. Las soluciones se prepararon por triplicado y se elaboró la recta de calibración de los analitos de estudio. La gráfica se compone de la relación área cromatográfica vs concentración. Los coeficientes de correlación, y el rango dinámico de trabajo se determinaron mediante el método de regresión lineal de mínimos cuadrados.

3.3.2. Selectividad

Se preparó una mezcla de estándares de COPs de 10ppm y se inyectó por triplicado a las condiciones descritas en la tabla 6. Se determinó el factor de capacidad, selectividad y resolución

3.3.3. Precisión

La precisión se determinó en términos de repetibilidad y reproducibilidad:

3.3.3.1. Repetibilidad

Se preparó una solución patrón de COPs de concentración 10 ppm y una solución patrón de colesterol de 160 ppm. Cada una se inyectó 6 veces el mismo día y por el mismo analista. La determinación de la repetibilidad se expresó en términos de porcentaje del coeficiente de variación. Se calcularon los límites de confianza al 95% para los tiempos de retención.

3.3.3.2. Reproducibilidad

Se preparó una solución patrón de COPs de concentración 10 ppm y una solución patrón de colesterol de 160 ppm. Cada una se inyectó en diferentes días (6 días). La determinación de reproducibilidad se expresó en términos de porcentaje del coeficiente de variación.

3.3.4. Exactitud

La determinación de la exactitud se realizó enriqueciendo una muestra de carne de pollo con 50 µL de una mezcla de estándares de COPs (25-OH, 7-OH y 7-Ceto) de 100 ppm. De la misma manera se preparó una muestra de carne de pollo sin enriquecer (blanco). La preparación de las muestras se realizó de acuerdo a lo descrito en el numeral 3.6.2.1 La exactitud del método se expresó en términos de porcentaje de recuperación. El análisis se realizó por triplicado.

3.3.5. Sensibilidad

Se inyectaron soluciones de COPs a bajas concentraciones (menores a 1ppm). Como señal del blanco se utilizó el ruido de fondo de los cromatogramas determinando la magnitud promedio de la señal y la pendiente de la curva de calibrado de la solución patrón de COPs. La sensibilidad del método se expresó en términos de límite de detección y cuantificación.

3.4. Diseño Experimental para el Análisis de COPs en Carne de Pollo:

Para el desarrollo del diseño experimental, las muestras de carne de pollo cruda se adquirieron en un mismo punto de venta. El proceso de preparación para la evaluación de los factores se realizó de manera controlada acorde a los procedimientos de preparación empleados en la fritura de la carne usados en los puntos de venta y comercialización de carne de pollo a la *Broaster*.

El diseño experimental se realizó con el fin de evaluar la formación de COPs en la carne de pollo comercializada en la ciudad de Pasto. Se tuvo en cuenta cuatro factores principales, que son: el tipo de aceite, tiempo de venta, tiempo de fritura y tipo de pieza usada. El diseño experimental utilizado fue multifactorial con dos niveles para cada factor. La descripción de los factores se presenta a continuación

- ✓ Tipo de aceite (T_a): En la preparación de alimentos cárnicos se utilizan aceites de tipo vegetal debido a su bajo contenido de colesterol, sin embargo 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 Oxidos de colesterol.
- ✓ Tiempo de venta (T_v): este factor describe el tiempo en el cual la carne de pollo, posterior a su proceso de fritura es almacenada y comercializada.
- ✓ Tipo de pieza (T_p): Se tuvo en cuenta los tipos de pieza de carne: Pechuga como parte del pollo con menor contenido de grasa y contramuslo como parte del pollo con mayor contenido de grasa.
- ✓ Tiempo de Fritura (T_f): El tiempo promedio fritura se encuentra entre los 20 y 40 min.

Tabla 8: Factores y Niveles del diseño experimental.

Factor	Nivel	Codificación en el diseño experimental	Descripción
Ta	Nuevo (Vn)	1	Aceite vegetal nuevo y reutilizado para la preparación de carne de pollo
	Reutilizado(Vr)	-1	
Tv	Inmediato T ₀	0	Tiempo de comercialización del pollo a la <i>Broaster</i> .
	1 día T ₁	24	
Tp	Pechuga	0	Dos tipos de pieza con contenido de colesterol y lípidos alto y bajo.
	Contramuslo	1	
Tf	20 min	-1	Dos tiempos de fritura comprendidos en un intervalo de 20 min a 40 min
	40 min	1	

Fuente: Esta Investigación

Otros parámetros que se determinaron en el presente estudio y que son covariables en la formación de óxidos de colesterol son:

- Cantidad de grasa en cada pieza de carne de pollo (% de Lípidos)
- Análisis de colesterol y COPs en materias primas usadas en la preparación de Pollo a la *broaster*.
- % Humedad

HIPOTESIS: La formación de óxidos de colesterol en la carne de pollo comercializada en la Ciudad de Pasto, está relacionada con los factores descritos anteriormente (tipo de preparación y factores de comercialización). Con el fin de verificar la hipótesis, se aplicó un diseño experimental, con un punto central en dos bloques experimentales. La siguiente tabla resume el diseño experimental.

Tabla 9: Resumen del Diseño Experimental.

Factores	Niveles		N° Niveles	Unidades
	Bajo	Alto		
Tiempo de Fritura	-1,0	1,0	2	Minutos
Tipo de Aceite	-1,0	1,0	2	
Tiempo de Venta	0,0	24,0	2	Horas
Tipo de Pieza	0,0	1,0	2	

Fuente: Esta Investigación

Se realizaron 32 experimentos aleatorizados utilizando un diseño experimental tipo factorial multinivel que consiste en dos bloques experimentales que incluyen los 2 niveles para cada factor.

Tabla 10: Diseño Experimental con 2 puntos centrales

BLOQUE	Tiempo de Fritura	Tipo de Aceite	Tipo de Venta	Tipo de Pieza	Variable Respuesta COPs Totales
	minutos		Horas		µg/g
1	-1	-1	24	0	
1	-1	1	24	1	
1	1	-1	24	1	
1	1	1	24	1	
1	1	-1	24	0	
1	-1	1	0	0	
1	-1	-1	0	0	
1	-1	1	24	0	
1	1	1	0	1	
1	1	-1	0	1	
1	1	-1	0	0	
1	1	1	24	0	
1	-1	1	0	1	
1	1	1	0	0	
1	-1	-1	24	1	
1	-1	-1	0	1	
2	-1	1	0	1	
2	1	1	24	1	
2	-1	-1	0	1	
2	1	-1	24	0	
2	1	-1	24	1	
2	1	1	0	0	
2	1	1	0	1	
2	1	1	24	0	
2	-1	1	24	0	
2	-1	1	0	0	
2	-1	-1	24	0	
2	-1	-1	24	1	
2	-1	-1	0	0	
2	1	-1	0	1	
2	-1	1	24	1	
2	1	-1	0	0	

Fuente: Esta Investigación

3.5. Análisis Estadístico

3.5.1. Análisis del Diseño Experimental

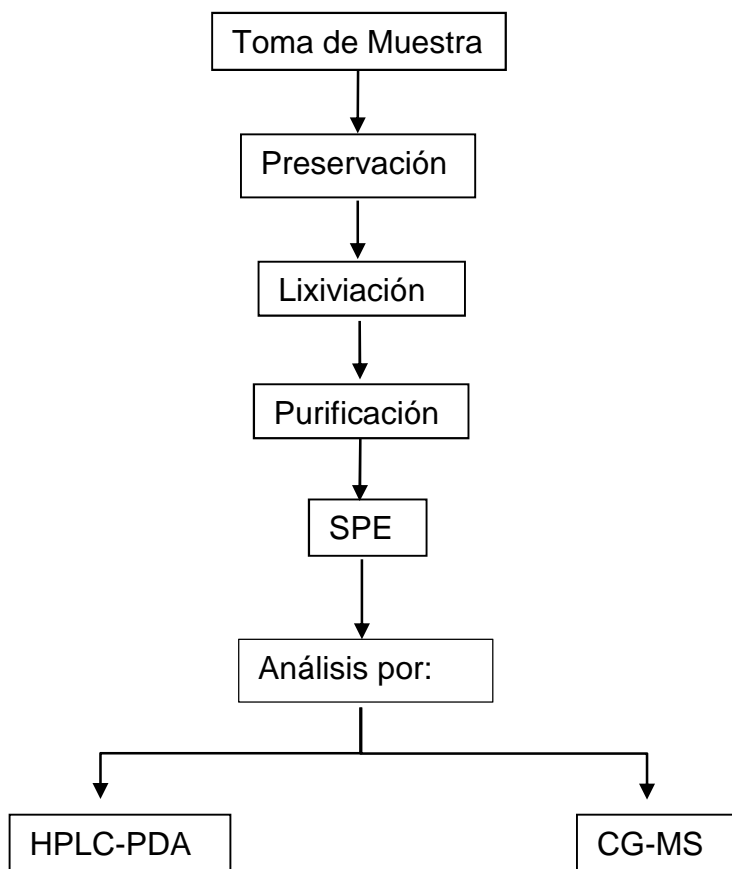
El análisis de resultados, se realizó mediante un análisis de varianza o ANOVA, el cual implica medidas de dispersión (media, mediana, desviación estándar)

3.5.2. Análisis de Correlaciones COPs - Parámetros Bromatológicos y Factores

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

El esquema general para la preparación de muestras de carne de pollo tipo *broaster* se indica en la figura 15.

Figura 15: Diagrama General para la Preparación y Análisis de las Muestras de Carne de Pollo tipo *Broaster*



Fuente: Esta investigación

3.6. Preparación de las Muestras para la Determinación de los Factores que Influyen a la Formación de COPs por HPLC.

3.6.1. Muestras

La carne de pollo se adquirió en un mismo establecimiento comercial. Las muestras de pollo crudo se empacaron en papel aluminio y bolsas de poliestireno y se refrigeraron a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$

3.6.2. Extracción de los Lípidos

3.6.2.1. Lixiviación:

Las muestras se homogenizaron. Se pesó 7.0 g de muestra y se introdujeron en un Erlenmeyer esmerilado de 100mL. Se añadió 70 mL de CHCl_3 y se sometió a agitación magnética en una plancha de agitación Velp Científica a 780 rpm durante 18 horas, protegiendo de la luz para evitar reacciones oxidativas durante el proceso. Posteriormente, se filtró a gravedad, se recogió el filtrado en un recipiente ámbar; el extracto de cloroformo se secó con Na_2SO_4 anhidro y se rotaevaporo a 40°C para eliminar completamente el CHCl_3 ⁹⁶.

Figura 16: Agitación en Cloroformo por 18 Horas.



Fuente: Esta Investigación

⁹⁶ MONTEZUMA A.; ALVAREZ W. (2014). *op, cit.*, p.52.

Figura 17: Filtración



Fuente: Esta Investigación

3.7. Determinación de COPs mediante HPLC en muestras de carne de Pollo

3.7.1. Extracción en fase sólida (SPE) con cartucho C18

El extracto obtenido en la sección 3.6.2.1 se disolvió en 6,0 mL de Isopropanol, posteriormente se pasó por un cartucho C18 de 500mg y 6,0 mL, previamente acondicionado con 5,0 mL de Acetonitrilo grado HPLC. Posteriormente se lavó con 10 mL de Acetonitrilo, se secó el cartucho con flujo de Nitrógeno, y se eluyeron los COPs con 6,0 mL de Metanol. El extracto se recogió sobre 300 μ L de buffer fosfato (pH 7,00). Seguido a lo anterior, se eliminó el metanol a 40°C. El residuo se disolvió en 250 μ L de Isopropanol, se filtró con membrana de nylon de 0,45 μ m y se conservó en vial ámbar a 4°C hasta el momento del análisis por HPLC⁹⁷ a las condiciones descritas anteriormente.

⁹⁷ LOZADA C. (2013). *op, cit.*, p.127

Figura 18: Cartuchos C18 utilizados para SPE



Fuente: Esta Investigación.

3.8. Determinación de Colesterol mediante HPLC en muestras de Carne de Pollo

El extracto obtenido en la 3.6.2.1 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, 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:Et₂O 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. El colesterol presente en las muestras se eluyó del cartucho adicionando 10 mL de acetona. Los extractos se rotaevaporaron a 38 °C; el exceso de solvente fue eliminado con flujo de nitrógeno a temperatura ambiente⁹⁸.

⁹⁸ MONTEZUMA A.; ALVAREZ W. (2014). op, cit., p.52

Figura 19: Cartucho Silica Para la determinación de Colesterol mediante SPE.



Fuente: Esta Investigación

3.9. Preparación de muestras de aceite vegetal nuevo y usado

Se tomaron 100 μ L de aceite nuevo y reutilizado, se disolvieron en 6mL de Isopropanol y se realizó el procedimiento descrito en el numeral 3.7.1.

3.10. Determinación de COPs en muestras de Carne de pollo tipo *broaster* comercializada en la Ciudad de Pasto.

Con el propósito de determinar la presencia de óxidos de colesterol en muestras de carne de pollo tipo *broaster* comercializada en la Ciudad de Pasto, se realizó un muestreo en diferentes puntos de venta de la Ciudad. Para este propósito, se realizó un muestreo totalmente aleatorio en 19 puntos de venta ubicados en diferentes sectores de la Ciudad de Pasto. Cada punto de venta se denominó con un código alfa numérico para el procesamiento de los datos, esto con el fin de proteger la identidad de los comercializadores de este producto.

Las muestras se empacaron en bolsas de polipropileno y se almacenaron en neveras de icopor a -18°C para ser transportadas al laboratorio. Cada muestra contiene el rotulo de la fecha de adquisición, código del sector de la ciudad y tipo de pieza. El procesamiento de las muestras y el análisis de COPs se realizaron de acuerdo a lo descrito en el numeral 3.6.2.1.

3.11. Análisis de COPs por GC-MS

El extracto obtenido en la sección 3.7.1 se concentró con N₂ y se derivatizó con reactivo Tri-Sil (HDMS:TMCS:Piridina) Thermo Scientific, la mezcla se agitó vigorosamente durante 2 min. Seguidamente, la reacción fue llevada a cabo a 60 °C durante 45 min dentro del sistema de calentamiento Eyela. El exceso de Tri-Sil fue eliminado mediante flujo de Nitrógeno. Posteriormente, se añadió el residuo 400 µL de Hexano agitando vigorosamente durante 2 min. 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-MS⁹⁹.

Figura 20: Sistema Térmico para Derivatización



Fuente: Esta Investigación

⁹⁹ LOZADA C. (2013). *op, cit.*, p.133

3.12. Determinación de Parámetros Bromatológicos de la Muestra

Se tuvo en cuenta los parámetros que intervienen en la formación de COPs como la humedad, porcentaje lipídico y contenido inicial de colesterol de las muestras de carne de pollo. Estos factores son covariables, su determinación se realizó de acuerdo a lo descrito en la tabla 11.

Tabla 11: Análisis Bromatológico

Parámetro	Método	Técnica
Humedad	Secado en Balanza de Humedad.	Gravimétrica
Lípidos	Extracción Sólido-Líquido	Gravimétrica
Colesterol	HPLC-PDA	Cromatografica

Fuente: Esta Investigación

3.13. Transformación Térmica del Colesterol en sus óxidos y Actividad Antioxidante

Se realizó tratamiento térmico a patrones de colesterol a diferentes temperaturas 120°C, 150°C, 180°C y 220°C en un tiempo de 30 min, 60 min, 120min y 180 min respectivamente¹⁰⁰. Para realizar el control, se preparó un blanco de colesterol de concentración 10000 ppm sin tratamiento térmico. La reacción se realizó en un termoreactor EYELA MG-2200. Posteriormente se inyectaron las muestras en el cromatógrafo HPLC-PDA a las condiciones descritas en la tabla 4.

El uso de agentes antioxidantes naturales se encuentra ampliamente estudiado con el propósito de minimizar la formación de compuestos no deseados durante los procesos de preparación a los que son sometidos los alimentos. Con el propósito de determinar el efecto que tienen los extractos antioxidantes en los procesos de transformación de colesterol se realizaron ensayos utilizando un extracto etanólico de Romero de acuerdo a lo reportado por Barriuso¹⁰¹, en diferentes muestras que fueron estudiadas en el presente trabajo de investigación. La tabla 12 indica el desarrollo metodológico de esta sección.

¹⁰⁰ DEREWIAKA, D.; MOLI SKA, E. Cholesterol transformations during heat treatment. En: Food chemistry, 2015, vol. 171, p. 233-240.

¹⁰¹ BARRIUSO, Blanca, et al. Role of Melissa officinalis in cholesterol oxidation: Antioxidant effect in model systems and application in beef patties. En: Food Research International, 2015, vol. 69, p. 133-140.

Dentro de los procesos de preparación de alimentos tradicionales en el Departamento de Nariño, se emplean adobos de origen natural. Además de aportar textura y sabor a los alimentos, el adobo también es empleado para la conservación de los mismos, por lo que su uso hace parte de la cultura culinaria de la región, y se convierte en una alternativa adecuada para minimizar los efectos adversos que tienen los COPs sobre la salud.

Tabla 12: Descripción de Ensayos Extracto Antioxidante

Experimento	Muestra	Concentración Muestra(mg/L)	Volumen Muestra μL	Concentración Extracto (mg/L)	Volumen Extracto (μL)
1	Colesterol	10	20		
2	Colesterol + Romero		20	200	20
3	Pollo crudo		100		
4	Pollo crudo + Romero		100	200	20
5	Aceite Nuevo		100		
6	Aceite Nuevo + Romero		100	200	20
7	Aceite Reutilizado		100		
8	Aceite Reutilizado + Romero		100	200	20

Fuente: Esta Investigación

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Condiciones Cromatográficas

La tabla N° 13 indica las condiciones cromatográficas determinadas para el análisis de los óxidos de Colesterol: 25-Hidroxicolesterol, 7-Cetocolesterol y 7 - Hidroxicolesterol.

Tabla 13: Condiciones de HPLC en Fase Reversa para el Análisis de COPs y Colesterol.

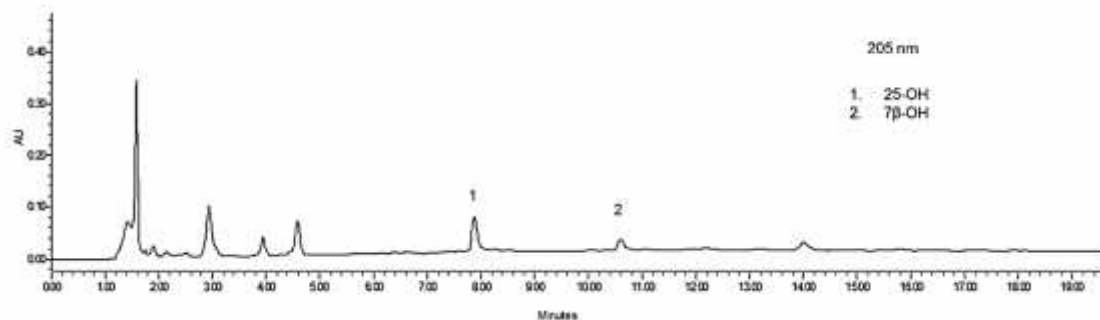
Volumen de Inyección (µL)	20
Fase móvil	ACN:AGUA
Detector	PDA
Modo de separación COPs y colesterol	Isocrático
<ul style="list-style-type: none"> • Composición Fase Móvil (V/V) COPs <li style="text-align: center;">• • Composición Fase Móvil (V/V) Colesterol 	<p style="text-align: center;">80:20</p> <p style="text-align: center;">90:10</p>
Longitud de Onda (nm)	<p>25-Hidroxicolesterol: 205nm</p> <p>7 -Hidroxicolesterol: 205nm</p> <p style="text-align: center;">Colesterol: 205nm</p> <hr style="width: 50%; margin: auto;"/> <p style="text-align: center;">7-Cetocolesterol: 238nm</p> <hr style="width: 50%; margin: auto;"/>
Flujo (mL/min)	1,25

Fuente: Esta Investigación

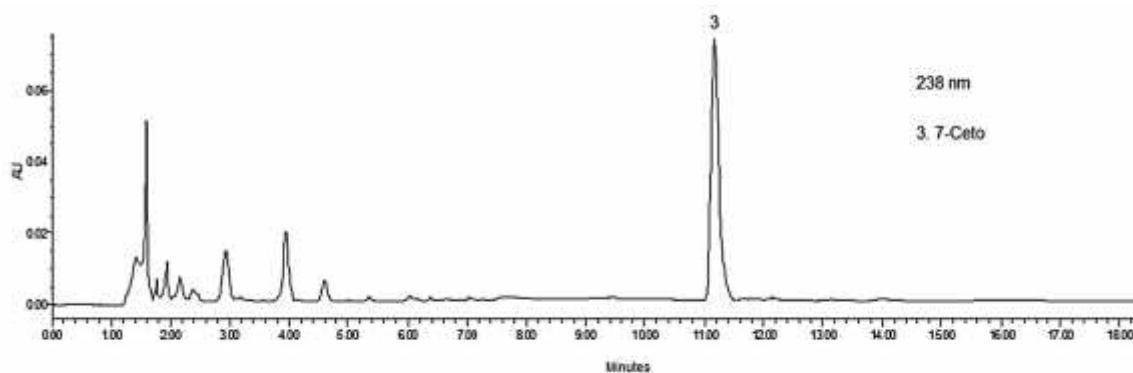
Bajo las condiciones operacionales descritas en la tabla 13 se inyectaron soluciones estándar de 25-hidroxicolesterol, 7 -Hidroxicolesterol, 7-Cetocolesterol y Colesterol

Los cromatogramas de los estándares demuestran que los picos presentan simetría adecuada, como lo indica la Figura 21 y 22.

Figura 21: Cromatogramas de la mezcla de Estándares de 10 ppm a 205 y 238 nm



Fuente: Esta Investigación



Fuente: Esta Investigación

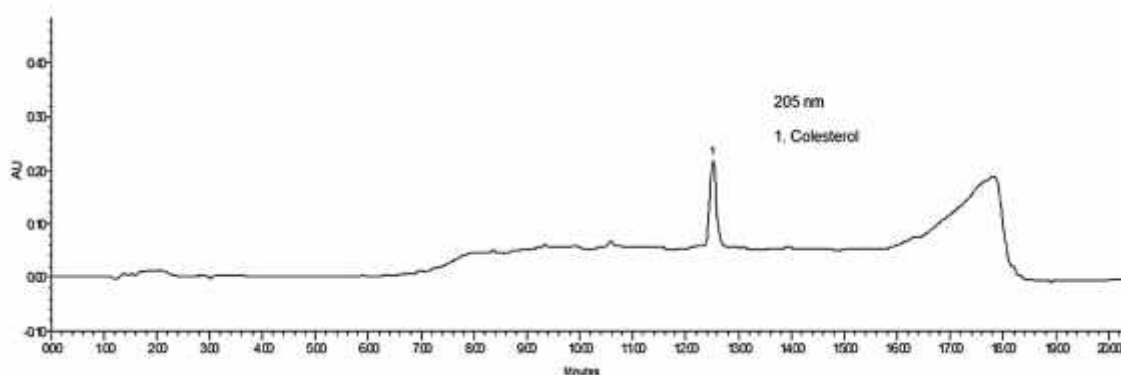


Figura 22: Cromatograma Estándar de Colesterol a 205 nm.

Fuente: Esta Investigación

Los parámetros que definen la capacidad de separación cromatográfica de los COPs en las condiciones establecidas se presentan a continuación.

Tabla 14: Parámetros de Separación de los Picos Cromatograficos

COPs	Ancho del pico (min)	Factor de Capacidad $\frac{t_r - t_m}{t_m}$	Resolución $\frac{2.1 t_r}{\sum W}$	Factor de Selectividad $\frac{k_s}{k_A}$
25-OH	0.236	3.994		
7 -OH	0.295	5.714	10,232	1.430
7-Ceto	0.462	5.689	7.693	1.0

Fuente: Esta Investigación

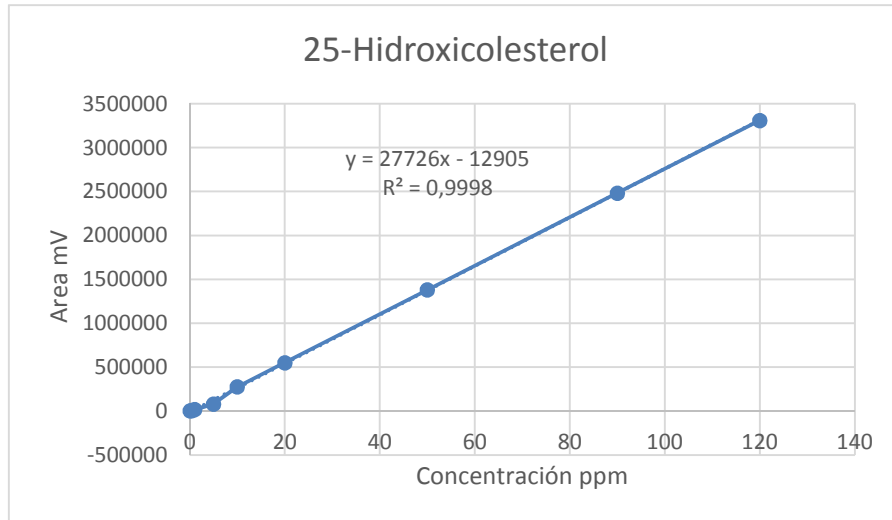
Los factores de selectividad fueron mayores a la unidad indicando la buena separación que presentó la columna. Los factores de resolución indican que los picos cromatograficos se separaron satisfactoriamente, teniendo como límite mínimo de aceptación el valor de 1,5. Cabe resaltar que el 7-Cetocolesterol presenta detección 238nm, lo que permite una mayor selectividad en su identificación.

4.2. Evaluación del Método

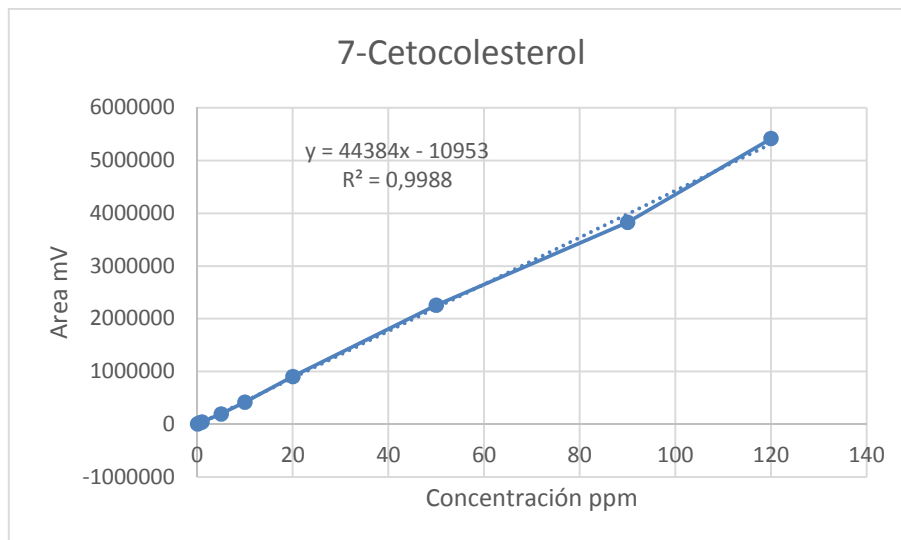
4.2.1. Linealidad

Con los datos obtenidos de las inyecciones de los patrones a diferentes concentraciones, se graficaron las rectas de calibración para cada estándar de COPs. Se determinó la linealidad en la relación área Vs concentración de estándar mediante la aplicación del método de los mínimos cuadrados. A continuación se ilustran las curvas de calibrado.

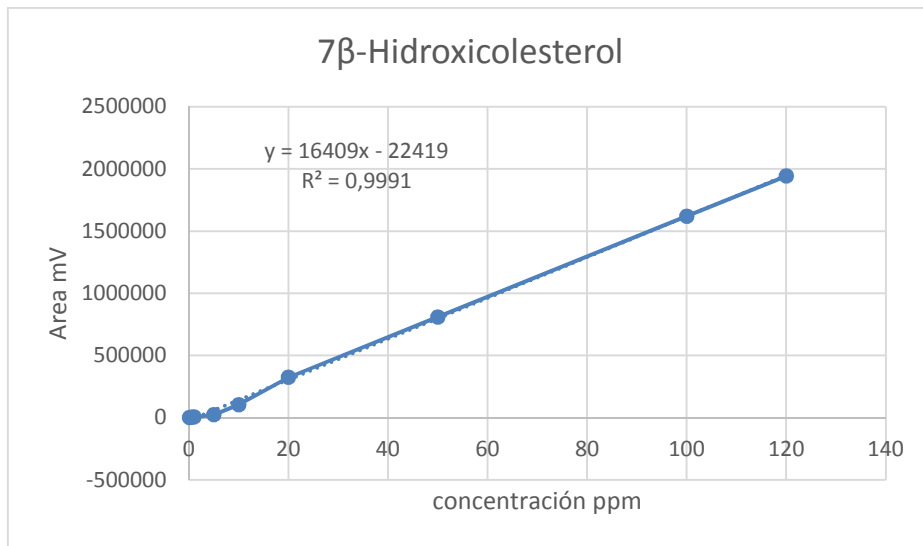
Grafica 1: Curvas de Calibración Para COPs y Colesterol



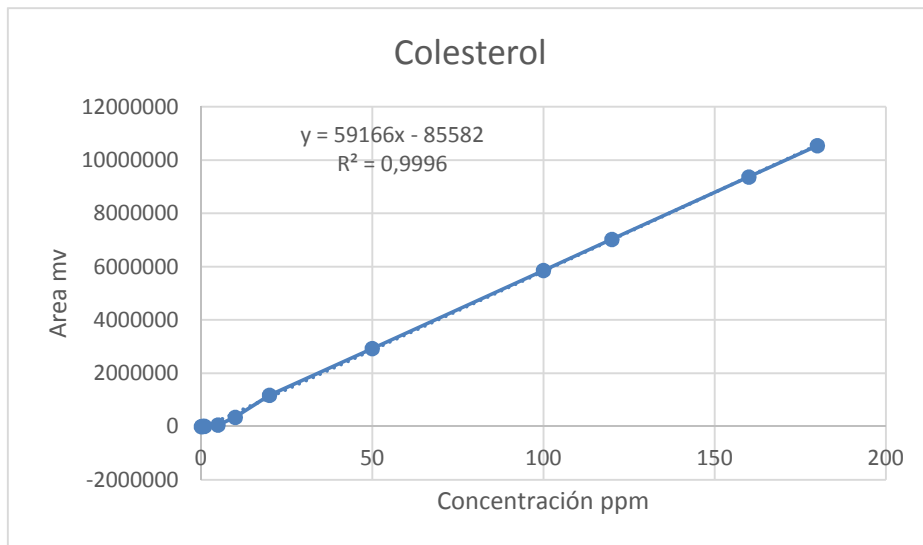
Fuente: Esta Investigación



Fuente: Esta Investigación



Fuente: Esta Investigación



Fuente: Esta Investigación

De acuerdo a los valores consignados en la tabla 15, las curvas de calibración cumplen los parámetros de linealidad debido al valor de R^2 y a la prueba de T-Student. Los valores que cumplen el rango dinámico lineal fueron de 0,1 a 100 ppm.

Tabla 15: Parámetros de las Rectas de Calibración de COPs

Compuesto	Ecuación de la Recta de Calibración	R ²	Tr _{exp}	t 95%	Comparación
25-OH	y = 27726x - 12905	0,9998	185,036	2.5706	185.036>>2.5706
7 -OH	y = 16409x - 22419	0,9991	88,3888	2.5706	88,3888>>2.5706
7-Ceto	y = 44384x - 10953	0,9988	75,0426	2.5706	75.0426>>2.5706
Colesterol	y = 59166x - 85582	0,9996	145,75	2.5706	145,75>>2.5706

Fuente: Esta Investigación

La estimación de los valores estadísticos de la curva de calibración son aceptables. Se determinaron factores de correlación cercanos a la unidad. Los valores de la prueba T-student presentan el condicional T exp >> T teórico al 95%. Lo anterior indica que los valores de respuesta del detector PDA expresados en área cromatográfica para cada óxido de colesterol son linealmente dependientes de la concentración.

4.2.2. Sensibilidad

4.2.2.1. Límite de Detección y Límite de Cuantificación

Los límites de detección determinados en el presente trabajo presentan rangos de 0.8 a 3.41 µg/L. Por lo cual se puede demostrar que el método de análisis de óxidos de colesterol por HPLC-PDA presenta una adecuada sensibilidad, ya que por tratarse de matrices complejas se requieren métodos de detección a concentraciones bajas. En comparación con otros trabajos realizados, se reportan, como parámetros de validación en muestras de alimentos intervalos de 0.5 a 3,0 µg/L para COPs¹⁰².

¹⁰² DANESHFAR, A.; KHEZELI, T.; LOTFI, H. J. Determination of cholesterol in food samples using dispersive liquid-liquid microextraction followed by HPLC-UV. En: Journal of Chromatography B, 2009, vol. 877, n° 4, p. 456-460.

Tabla 16: Límite de Detección y Límite de Cuantificación

COMPUESTO	Área Media ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$)	S	RSD %	Pendiente m	LD $\mu\text{g/L}$	LQ $\mu\text{g/L}$
25-OH	17,18	0,873	68.52	27726	1,859	6,197
7 -OH	17,18	0,873	68.52	16409	3,141	10,470
7-Ceto	23,8	3,489	82.85	44384	1,608	5,362
Colesterol	17,18	0,873	68.52	59166	0,871	2,904

Fuente: Esta Investigación

4.2.3. Precisión y Límites de Confianza

4.2.3.1. Repetibilidad

La repetibilidad se calculó mediante la determinación del porcentaje de RSD de los estándares de óxidos de colesterol analizados. Se realizaron 6 inyecciones bajo las mismas condiciones operacionales que son empleadas para los análisis. La tabla 17 registra los valores de repetibilidad.

Tabla 17: Repetibilidad de los COPs

Inyección	25-OH		7 -OH		7 Ceto	
	Tr (min)	Area (μV*sec)	Tr (min)	Area (μV*sec)	Tr (min)	Area (μV*sec)
1	7,908	221317	10.432	455402	10,958	409508
2	7,911	212209	10.410	454872	11,001	430716
3	7,916	225163	10.425	471008	11,025	408447
4	7,922	230743	10.441	440024	10,736	430585
5	7,906	211891	10.455	456614	11,056	408994
6	7,945	214755	10.477	455629	10,896	419581,5
Media	7,918	219346,333	10.440	455591,50	10,945	417971,917
S	0,014	7683,814	23,597	9814,439	0,117	10649,481
RSD%	0,182	3,503	0,226	2,154	1,066	2,548
Límites de Confianza al 95%	7,918 ± 0,015		10,44 +/- 0,025		10,9453 +/- 0,122	

n=6

Fuente: Esta Investigación

4.2.3.2. Reproducibilidad

Tabla 18: Reproducibilidad de los COPs

Inyección	25-OH		7 -OH		7 Ceto	
	Tr (min)	Area (μV*sec)	Tr (min)	Area (μV*sec)	Tr (min)	Area (μV*sec)
Día 1	7,955	227956,51	10,421	464510,04	10,747	417698,16
Día 2	8,018	218575,27	10,276	463969,44	10,905	439330,32
Día 3	7,924	231917,89	10,296	480428,16	10,875	416615,94
Día 4	7,913	237665,29	10,308	448824,48	10,749	439196,7
Día 5	7,927	218247,73	10,450	465746,28	10,869	417173,88
Día 6	7,913	221197,65	10,331	464741,58	10,905	427973,13
Media	7,942	225926,723	10,347	464703,33	10,842	426331,355
S	0,040	7914,329	0,071	10010,727	0,074	10862,470
RSD%	0,509	3,503	0,689	2,154	0,683	2,548

n=3

Fuente: Esta Investigación

Los resultados obtenidos en las mediciones para la determinación de la precisión del método cromatográfico presentaron desviaciones relativas estándar adecuadas para los tiempos de retención y áreas cromatograficas. Los RSD% son inferiores al 5%. Dado a la complejidad de las muestras, los RSD aceptados están en un rango del 7 al 10%. Por lo anterior, se puede concluir que el método para el análisis de óxidos de colesterol por HPLC presento una buena precisión¹⁰³.

¹⁰³ Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, Q2 (R1), International Committee on Harmonization (2005). p. 8-13.

4.2.4. Exactitud

La exactitud se calculó en términos de porcentaje de recuperación mediante la relación.

$$\%R = \frac{COPs\ B}{COPs\ A} \times 100\% \quad \text{Ecuacion 1}$$

Donde:

- COPs B = Concentración de COPs Enriquecida = (COPs Encontrada – COPs muestra)
- COPs A = Concentración de COPs sin enriquecer

La tabla N° 19 registra los valores de la exactitud del método de extracción, expresado en el cálculo del porcentaje de recuperación de los COPs.

Tabla 19: Porcentaje de Recuperación.

COPs ^a	% de Recuperación ^b	RSD, %
25-OH	95,2	0,94
7β-OH	90,2	2,0
7-Ceto	91,2	2,4

a = nivel de concentración de enriquecimiento de las muestras = 1,0 µg/g, b = valor promedio n=3

Fuente: Esta Investigación

Los porcentajes de recuperación fueron satisfactorios teniendo en cuenta el tipo de matriz en la cual se determinaron estos compuestos. También es importante tener en cuenta que durante el proceso de preparación de las muestras y especialmente en el proceso de purificación con cartucho C18 se logró minimizar las pérdidas generadas en este tipo de procedimientos.

4.3. Niveles de Colesterol y COPs en Materias Primas y en la Carne de Pollo

4.3.1. Colesterol en Materias primas

La determinación de la concentración del colesterol y óxidos de colesterol en las materias primas utilizadas en el diseño experimental (carne de pollo cruda y el aceite de fritura) es de gran importancia para poder determinar el efecto que tienen los diferentes procesos de preparación en la oxidación del colesterol.

La siguiente tabla registra los valores determinados para estas muestras.

Tabla 20: Concentración de Colesterol en Materias Primas

Muestra	Colesterol (μg)
Pechuga	19.65
Contramuslo	82.35
Aceite Nuevo	ND
Aceite Viejo	ND

n=3

ND: no detectado

Fuente: Esta Investigación

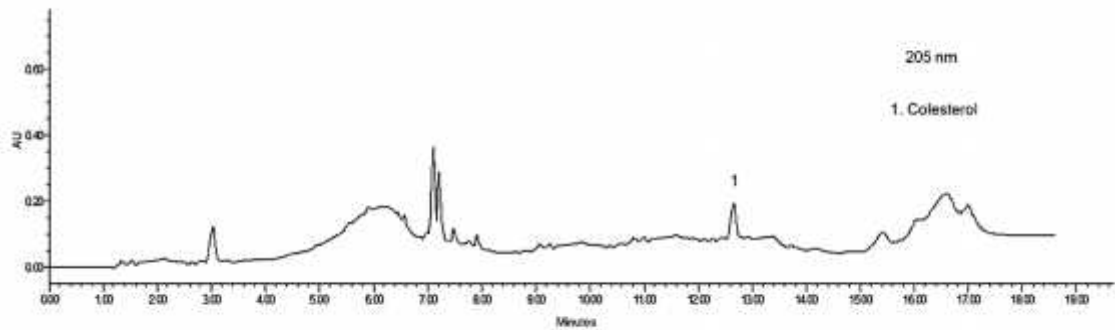
El contenido de colesterol para las piezas crudas de carne de pollo son coherentes con los datos reportados en la tabla de composición de alimentos colombianos del Instituto Colombiano de Bienestar Familiar ICBF¹⁰⁴. La menor cantidad de colesterol se obtuvo en la pieza pechuga y la mayor cantidad fue para contramuslo. Por otra parte, en el análisis de colesterol en aceite nuevo no se detectó este compuesto; lo que concuerda con los datos reportados por el ICBF. En el aceite reutilizado, tampoco se detectó la presencia de este compuesto. Una de las causas que explica la ausencia del colesterol, es la relacionada con los hidroperóxidos lipídicos generados por autoxidación de ácidos grasos poliinsaturados y los radicales alcoxilo y peroxilo generados a partir de los

¹⁰⁴ INSTITUTO COLOMBIANO DE BIENESTAR FAMILIAR. Tabla de composición de alimentos colombianos. 2a Edición. Bogotá: ICBF. (2015). p. 321. ISBN: 978-958-623-186-2.

mismos, los cuales afectan, tanto al colesterol como a otros lípidos presentes en el aceite^{105, 106}.

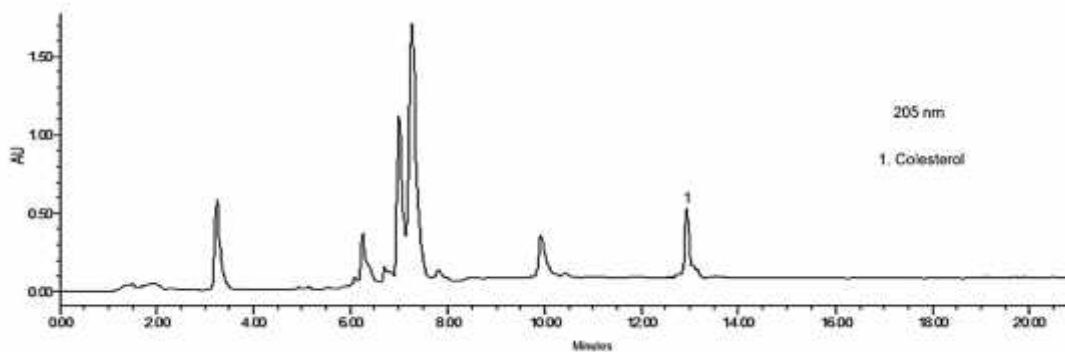
Figura 23: Cromatogramas Análisis de Colesterol en Materias Primas

A: Pechuga Cruda.



Fuente: Esta Investigación

B: Contramuslo Crudo.

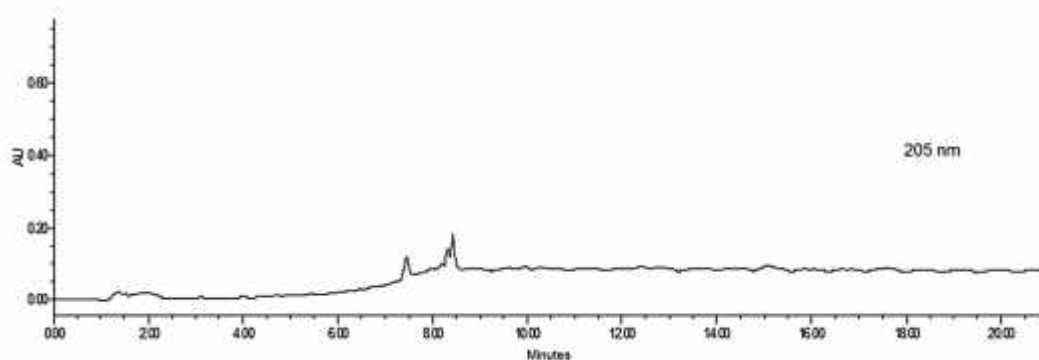


Fuente: Esta Investigación

¹⁰⁵ DELGADO, Wilman. ¿Por qué se enrancian las grasas y aceites? En: Revista Palmas, 2004, vol. 25, n° 2, p. 35-43.

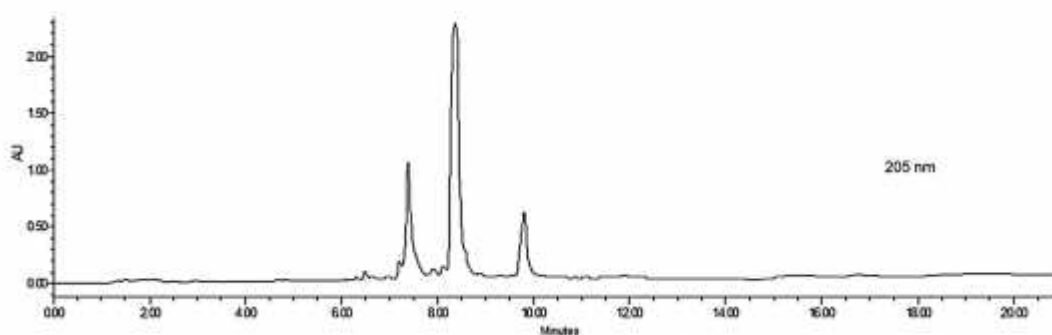
¹⁰⁶ HUR, Sun-Jin; PARK, G. B.; JOO, S. T. Formation of cholesterol oxidation products (COPs) in animal products. En: Food Control, 2007, vol. 18, no 8, p. 939-947.

C: Aceite Nuevo.



Fuente: Esta Investigación

D: Aceite Reutilizado



Fuente: Esta Investigación

4.3.2. COPs en Materias Primas

Las concentraciones de COPs iniciales influyen en la formación de estos compuestos en el proceso de fritura de la carne de Pollo, de acuerdo a lo descrito en el Diseño experimental. En la tabla 21 se registran las concentraciones de COPs en las piezas de pollo crudo y aceite vegetal nuevo y reutilizado.

Tabla 21: COPs en Materias Primas

MUESTRA	COMPUESTO	µg/g COPs
Pechuga	25-OH	1,224
	7 -OH	ND
	7-Ceto	ND
Contramuslo	25-OH	2,049
	7 -OH	ND
	7-Ceto	ND
Aceite Nuevo	25-OH	ND
	7 -OH	ND
	7-Ceto	ND
Aceite Reutilizado	25-OH	17,461
	7 -OH	0,166
	7-Ceto	ND

n=3

ND: no detectado

Fuente: Esta Investigación

En cuanto a los resultados se puede observar una diferencia significativa entre las muestras de carne de pollo cruda y el tipo de aceite. La presencia de 25-Hidroxicolesterol en la carne cruda puede estar relacionada a posibles alteraciones en las condiciones de almacenaje de las piezas de pollo antes de ser adquiridas (muestras comerciales) de las cuales no se conoce en qué medida el rompimiento de la cadena de frío habría influido en el nivel de COPs en la materia prima inicial. De acuerdo a Conchillo¹⁰⁷, la concentración de los oxiesteroles: 7-Ceto, 7 -OH, 25-OH y -Epoxy, fue menor en el almacenamiento al vacío que en almacenamiento aerobio, lo que protegería el colesterol de la oxidación. De igual manera, la presencia de 25-Hidroxicolesterol y 7 -Hidroxicolesterol en el aceite reutilizado, indica que el aceite sometido a fritura es degradado, cambiando dinámicamente su composición a una mezcla de compuestos polares (diglicéridos, monoglicéridos, ácidos grasos libres y glicerol). Estos compuestos de degradación

¹⁰⁷ CONCHILLO, Ana; ANSORENA, Diana; ASTIASARÁN, Iciar. Intensity of lipid oxidation and formation of cholesterol oxidation products during frozen storage of raw and cooked chicken. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2005, vol. 85, no 1, p. 141-146

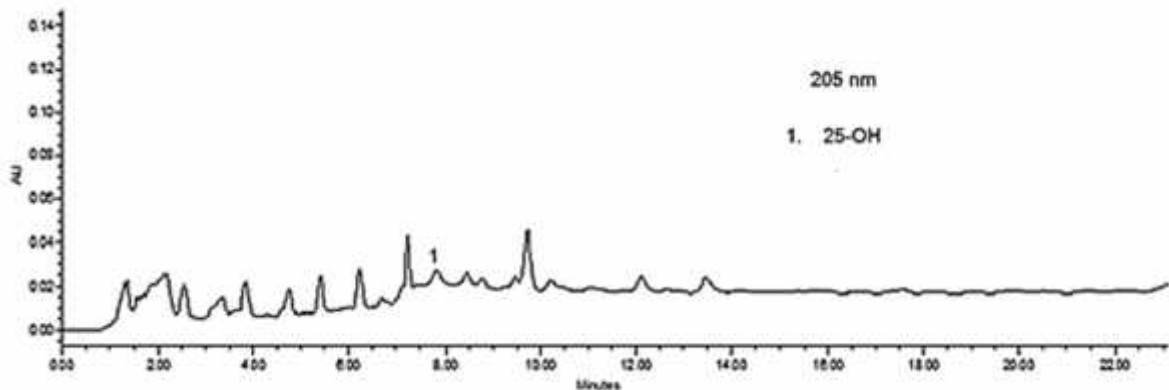
actúan como agentes humectantes, Que sirven para reducir la tensión superficial entre el aceite y agua, aumentando la absorción del aceite al alimento. A mayor cantidad de agentes humectantes liberados se provoca un aumento en la viscosidad, generando una mayor cantidad de aceite adherido a la superficie del alimento. Además la tensión interfacial entre el alimento y el aceite disminuye, facilitando de esta manera su absorción¹⁰⁸.

Por otra parte, no se detectaron óxidos de Colesterol en aceite nuevo. Esto se debe a que los aceites, con un alto contenido de ácido oleico presentan mayor estabilidad en su estructura química al someterlos a altas temperaturas. Además los aceites de origen vegetal no presentan contenidos de colesterol, a diferencia de las grasas de origen animal.

La figura 24 ilustra los cromatogramas de las materias primas pollo crudo y aceite.

Figura 24: Cromatogramas de COPs en Materias Primas

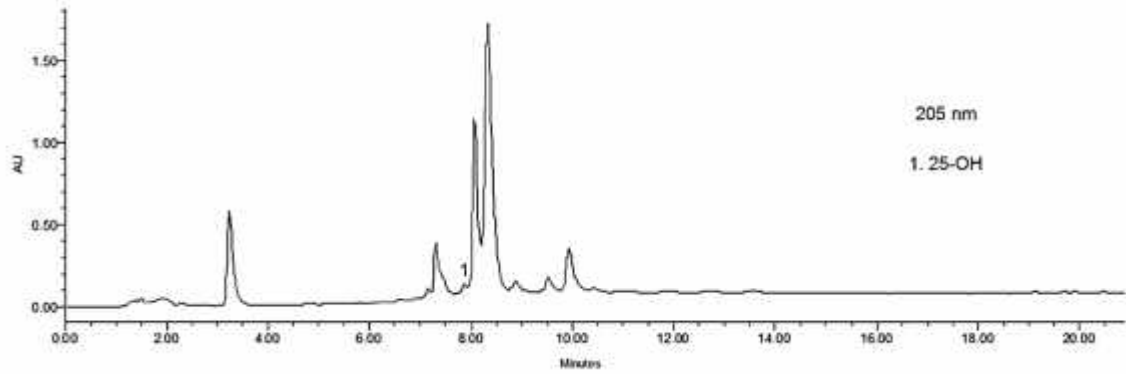
A: Pechuga Cruda



Fuente: Esta Investigación

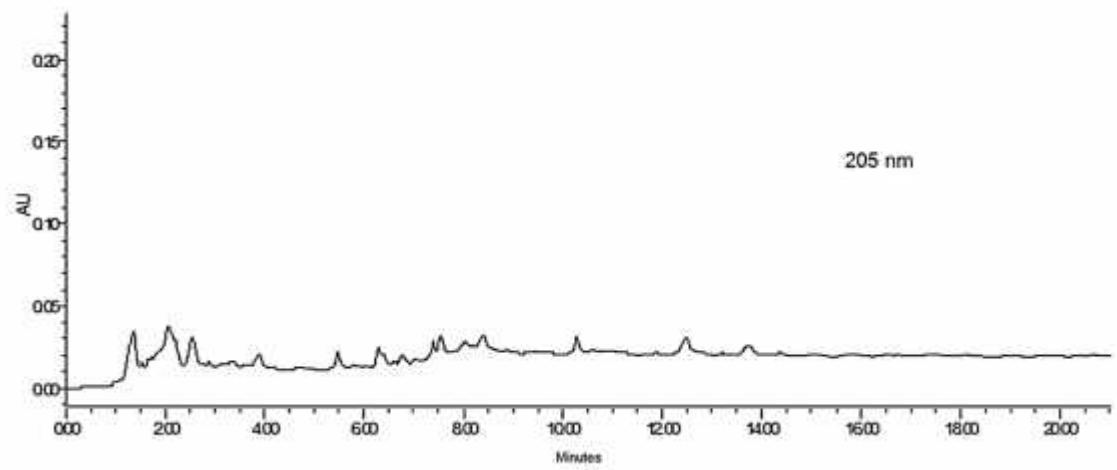
¹⁰⁸ BRANNAN, Robert G., et al. Influence of ingredients that reduce oil absorption during immersion frying of battered and breaded foods. *En: European journal of lipid science and technology*, 2014, vol. 116, no 3, p. 240-254.

B: Contramuslo Crudo



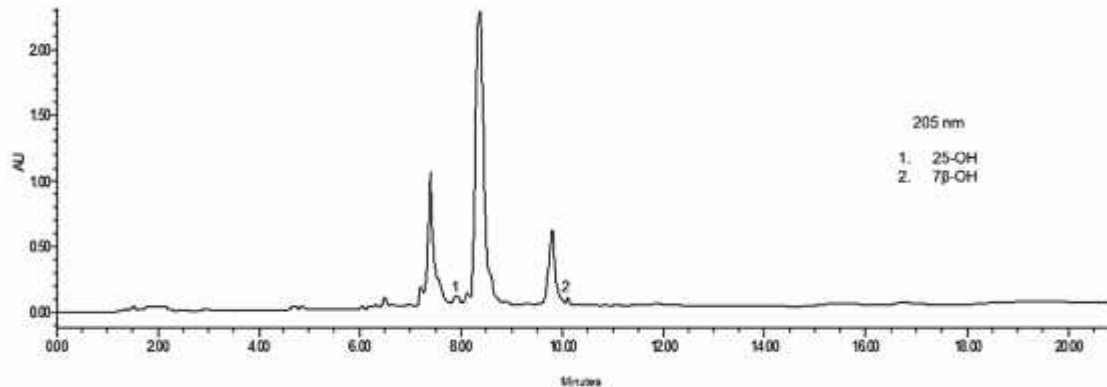
Fuente: Esta Investigación

C: Aceite Nuevo



Fuente: Esta Investigación

D: Aceite Reutilizado



Fuente: Esta Investigación

4.4. Parámetros Bromatológico de la Carne de Pollo

Los análisis bromatológicos de la carne de pollo, permiten conocer su composición química y su interacción con la formación de los compuestos de estudio. Se evaluó parámetros como porcentaje de Agua, lípidos y colesterol en muestras crudas y preparadas. El contenido de Agua en alimentos influye en el proceso de formación de compuestos tóxicos; los lípidos (grasas, fosfolípidos y esteroides) presentes en alimentos, generan peroxidación lipídica o rancidez oxidativa consecuencia de procesos en los que intervienen luz, calor, humedad y otros factores fisicoquímicos, siendo los ácidos grasos poliinsaturados los primeros en presentar la peroxidación¹⁰⁹, debido a la formación de radicales libres metilénicos. Estos radicales también son indicadores de la oxidación del colesterol¹¹⁰. El colesterol al poseer un carácter anfipático interactúa con los fosfolípidos en interfases óleo-acuosas, lo cual facilita su oxidación¹¹¹.

Los resultados de estas determinaciones se consignan en las tablas 22 y 23.

¹⁰⁹ DELGADO W. (2004). op, cit., p.36.

¹¹⁰ VALENZUELA A. (2002). op, cit., p.3.

¹¹¹ Ibid., p. 3

Tabla 22: Parámetros Bromatológicos de Carne de Pollo Crudo

Muestra	Agua (%)	Lípidos (%)	Colesterol (µg/g)
Pechuga	46.89	0,54	19.65
Contramuslo	34.77	22,79	82.35

n=3

Fuente: Esta Investigación

Tabla 23: Parámetros Bromatológicos en Carne de Pollo tipo *Broaster*.

Factores del Diseño Experimental	Agua (%)	Lípidos (%)	Colesterol (µg/g)
AcN-CM-24h-40min	14,86	62,50	0,12
AcN-P-24h-40min	54,63	26,85	ND
AcN-P-0h-40min	50,5	24,12	ND
AcN-P-0h-20min	47,00	25,52	ND
AcN-P-0h-20min	57,73	19,89	16,20
AcN-CM-0h-20min	21,7	69,14	6,18
AcR-P-0h-40min	44,24	10,38	ND
AcR-CM-0h-20min	20,57	66,90	ND
AcR-CM-24h-20min	29,71	50,12	ND
AcR-CM-24h-40min	31,07	48,40	ND
AcR-P-0h-20min	52,00	18,85	1,32
AcR-CM-0h-40min	14,48	47,28	ND
AcR-P-24h-40min	51,97	5,08	2,93
AcR-CM-0h-20min	21,79	47,32	4,87
AcR-P-0h-20min	60,00	3,21	ND
AcR-CM-24h-20min	27,43	63,54	ND

AcN: Aceite Nuevo; AcR: Aceite Reutilizado; CM: Contramuslo; P: pechuga.
 ND: no detectado

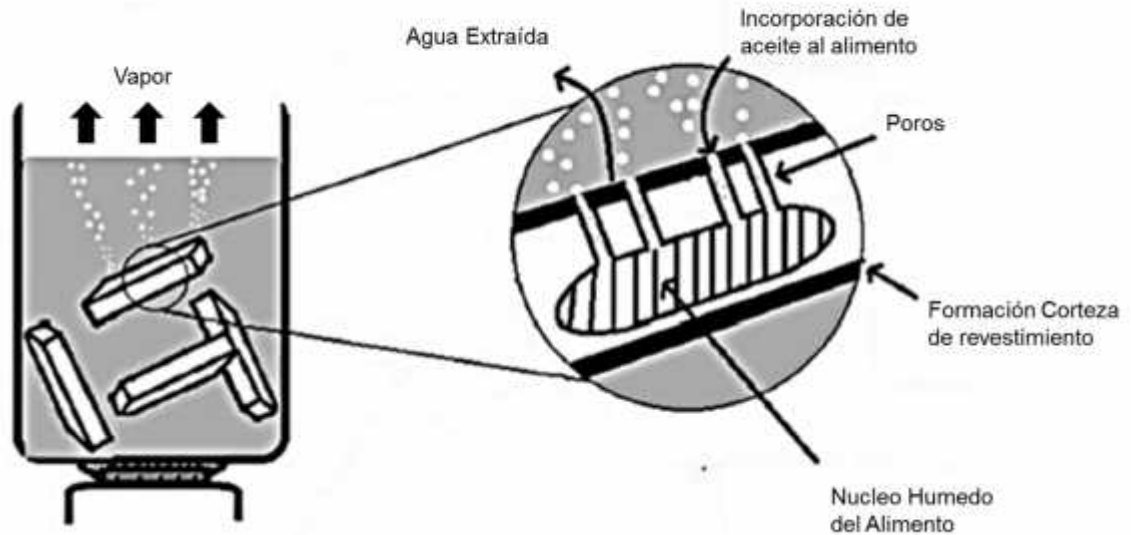
Fuente: Esta Investigación

El porcentaje de agua en el alimento es un parámetro importante en los procesos de formación de COPs. En relación a ello, en la investigación realizada por Gamble¹¹², observaron que el contenido de aceite no estaba directamente relacionado con la temperatura de fritura, sino con la humedad residual del alimento. Así, la mayor retención de aceite en el alimento tiene lugar cuando se presenta una disminución significativa en el porcentaje de agua del mismo, es decir, en el proceso de transferencia del contenido de agua al aceite de fritura. Además, la pérdida de agua no es uniforme en el producto, primero ocurre en la superficie y, según transcurre el calentamiento, va afectando gradualmente su contenido al interior del mismo. De acuerdo a lo anterior, el proceso de fritura involucra diferentes etapas en las cuales la humedad y los lípidos tienen incidencia en la formación de compuestos nocivos entre ellos los COPs. Este proceso se constituye en cuatro etapas. En la primera etapa, la superficie del alimento sumergido en aceite es sometido a una temperatura equivalente a la temperatura de ebullición del agua, en esta etapa la forma de transferencia de calor entre el aceite y el alimento es por convección natural y sin evaporación del agua de la superficie del alimento. Posteriormente, en la segunda etapa, en la superficie del alimento comienza a evaporarse el agua, el mecanismo de transferencia de calor cambia de convección natural a convección forzada, proceso en el cual, el vapor de agua liberado por el alimento, impide que el aceite ingrese. En la tercera etapa, ocurre la mayor pérdida de porcentaje de agua. La temperatura de la parte interna del alimento se acerca al punto de ebullición del agua, en este momento, se presentan algunos cambios físico-químicos tales como: desnaturalización de las proteínas, aumento en el espesor de la corteza superficial y la disminución de la velocidad de transferencia de vapor en la superficie. Por último, en la cuarta etapa, la velocidad de pérdida de la humedad disminuye y no hay burbujas que se observen en la superficie de los alimentos. Cabe destacar que la absorción de aceite en alimento es continua. El anterior proceso se ilustra en la figura 25¹¹³.

¹¹² GAMBLE, M. H.; RICE, P. Effect of pre-fry drying of oil uptake and distribution in potato crisp manufacture. En: International journal of food science & technology, 1987, vol. 22, n° 5, p. 535-548.

¹¹³ MONTES, Nicolás, et al. Absorción de aceite en alimentos fritos. En: Revista chilena de nutrición, 2016, vol. 43, no 1, p. 87-91.

Figura 25: Absorción del Aceite en Alimentos Fritos



Fuente: MONTES N.*et. al.* (2016)¹¹⁴

De acuerdo a la tabla 22, el porcentaje de agua en muestras crudas es mayor en la pieza pechuga (46,89%), constituyéndose en un factor de influencia en la formación de óxidos de colesterol, de acuerdo a lo explicado anteriormente. En los experimentos realizados, los cuales se describen en la tabla 23, el contenido de humedad en las muestras oscila en un rango entre el 14% al 60%.

El contenido de lípidos y colesterol son parámetros químicos que están relacionados con la formación de óxidos de colesterol. Es necesario tener en cuenta que el colesterol es una molécula muy sensible a la oxidación en ciertas condiciones (oxígeno molecular, radiación, temperatura, entre otras). Por otra parte, la fracción lipídica, principalmente su contenido de ácidos grasos incrementa la acción oxidativa del colesterol.

En la tabla 23 el porcentaje lipídico en las muestras de carne preparada aumentó con respecto a las muestras en crudo; durante el proceso de preparación, la pérdida de agua en el alimento aumenta la absorción de compuestos lipídicos propios del aceite, como los hidroperóxidos y otros compuestos polares, incrementando así la concentración lipídica en el alimento.

¹¹⁴ Ibid., p.88

Como se registra en la tabla 23, la concentración de colesterol disminuyó con respecto a la concentración inicial en las piezas crudas; el colesterol presente en las piezas de pollo sufren procesos de oxidación aumentando la concentración de COPs en la carne de pollo procesada.

4.5. Evaluación de los Factores que Influyen en la Formación de COPs

De acuerdo a los factores propuestos en el diseño experimental, la mayor formación de óxidos de colesterol se presentó cuando la muestra es sometida a procesos de cocción en los que se involucran los factores: tipo de aceite (Reutilizado) y tiempo de fritura (40 min). La tabla N° 24 registra los experimentos realizados con la variable de respuesta COPs totales expresada en ($\mu\text{g/g}$).

Tabla 24: Resultados del Diseño Experimental

Experimento	Aceite (tipo)	Tiempo de Venta (horas)	Tipo de pieza	Tiempo de Fritura (min)	COPs(µg/g)
1	-1	24	0	40	3,719
2	1	0	0	40	0,485
3	-1	0	1	40	2,002
4	1	24	1	40	1,708
5	-1	24	1	40	0,996
6	1	24	1	20	0,779
7	1	24	0	20	0,161
8	1	0	1	20	1,358
9	-1	0	1	20	1,076
10	-1	24	0	20	0,377
11	-1	24	1	20	0,498
12	-1	0	0	40	4,250
13	1	0	0	20	2,739
14	1	24	0	40	0,395
15	-1	0	0	20	1,366
16	1	0	1	40	1,688
17	-1	24	0	20	2,496
18	-1	0	0	40	5,331
19	-1	24	0	40	0,807
20	1	0	0	20	0,187
21	-1	0	1	20	3,103
22	1	0	0	40	0,354
23	1	0	1	20	0,308
24	1	0	1	40	0,219
25	1	24	0	40	0,498
26	-1	24	1	40	3,702
27	-1	0	1	40	4,218
28	1	24	1	40	0,208
29	-1	0	0	20	1,933
30	1	24	1	20	0,563
31	1	24	0	20	0,239
32	-1	24	1	20	0,860

Tipo de Aceite: (1) Aceite Nuevo; (-1) Aceite Reutilizado; Tipo de Pieza: (1) Contramuslo; (0) Pechuga
 COPs Totales Identificados: 25-OH, 7 -OH y 7-Ceto

Fuente: Esta Investigación

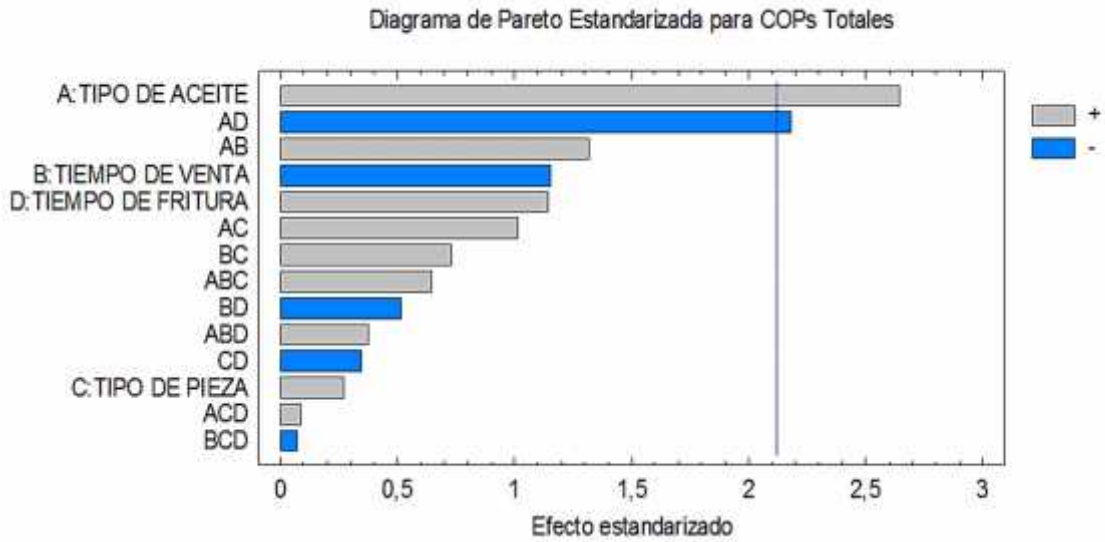
Los experimentos que corresponden a los factores: Aceite Reutilizado, tiempo de venta 0 horas, tiempo de fritura 40 min y tipo de pieza pechuga (experimentos N° 18 y 12), presentaron el mayor contenido de COPs totales (5,33 y 4.25 µg/g respectivamente). Para determinar los factores estudiados, que presentan mayor influencia en la formación de estos compuestos, se realizó el análisis del diseño experimental mediante el paquete estadístico statgraphics Centurion XV. Se observó la influencia de uno de los factores estudiados y una interacción entre dos factores. El factor tipo de aceite y la interacción entre tipo de aceite y tiempo de fritura, ejercieron una influencia en la variable de respuesta cuyo valor-p es inferior a 0,05, con lo cual se infiere que estos dos factores presentan diferencias estadísticamente significativas. Lo anterior se puede observar en la tabla ANOVA y en el gráfico de Pareto.

Tabla 25: ANOVA

Fuente	Razón-F	Valor-P
A:TIPO DE ACEITE	7,00	0,018
B:TIEMPO DE VENTA	1,33	0,266
C:TIPO DE PIEZA	0,07	0,791
D:TIEMPO DE FRITURA	1,31	0,269
AB	1,74	0,206
AC	1,02	0,327
AD	4,76	0,044
BC	0,53	0,476
BD	0,26	0,616
CD	0,12	0,734
ABC	0,41	0,529
ABD	0,14	0,713
ACD	0,01	0,932
BCD	0,00	0,945
bloques	0,02	0,880
Error total		
Total (corr.)		

Fuente: Esta Investigación

Gráfica 2: Diagrama de Pareto para COPs Totales

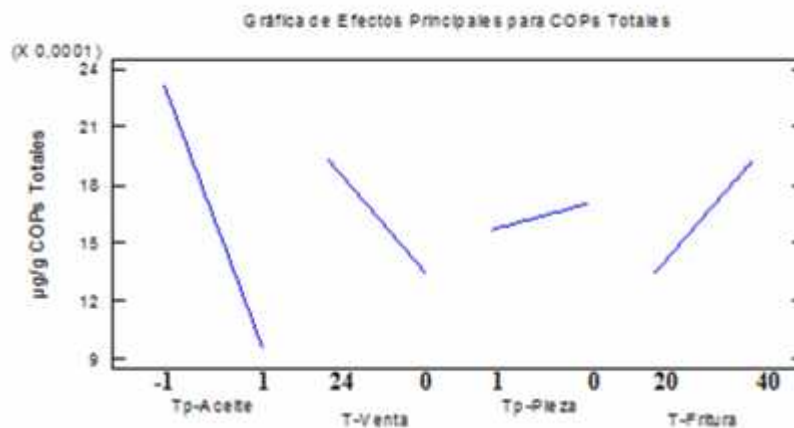


Fuente: Esta Investigación

El efecto estandarizado que presenta una significancia con un valor $p < 0.05$ corresponde al tipo de aceite utilizado en los experimentos.

El gráfico de efectos principales ilustra de la misma manera la influencia de los factores estudiados en la formación de óxidos de colesterol identificados. $\mu\text{g/g}$

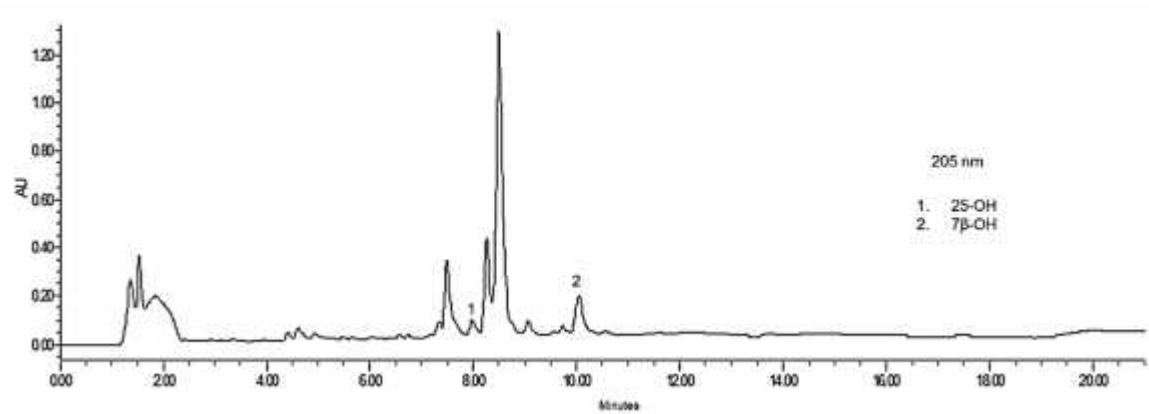
Gráfica 3: Efectos Principales para COPs totales



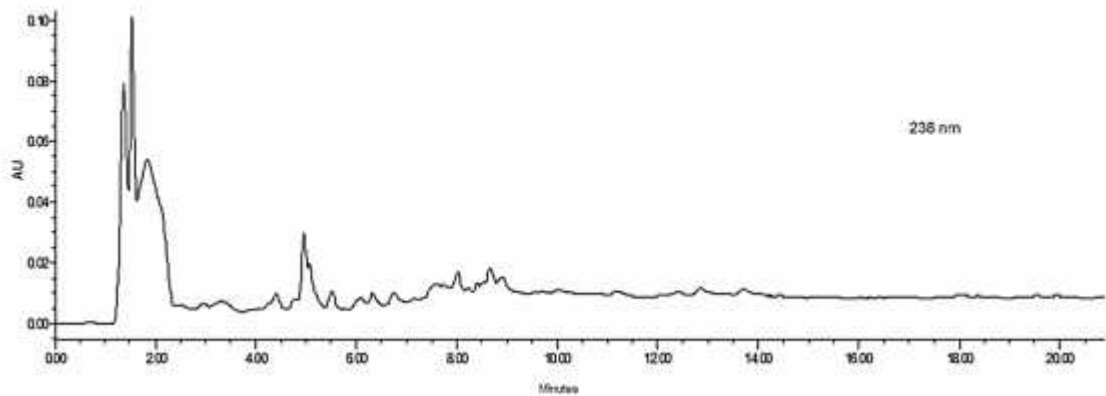
Fuente: Esta Investigación

La figura 26 y 27 ilustran los cromatogramas de los experimentos 12 y 18, los cuales presentan la mayor concentración de óxidos de colesterol identificados.

Figura 26: Cromatograma Experimento 12 a 205-238 nm.

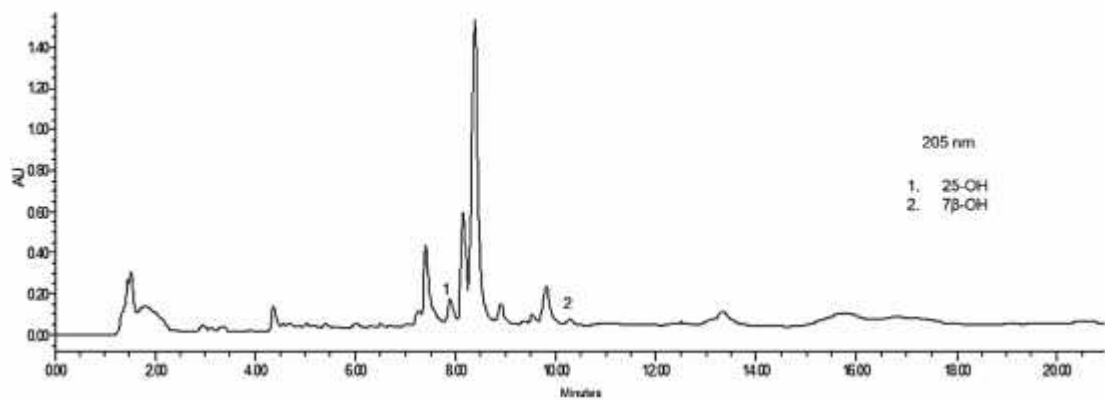


Fuente: Esta Investigación

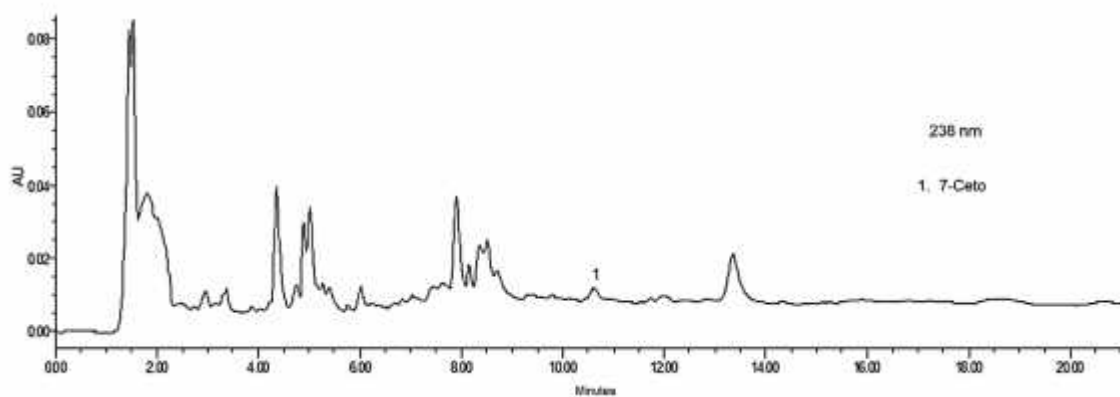


Fuente: Esta Investigación

Figura 27: Cromatograma Experimento 18 a 205 - 238 nm



Fuente: Esta Investigación

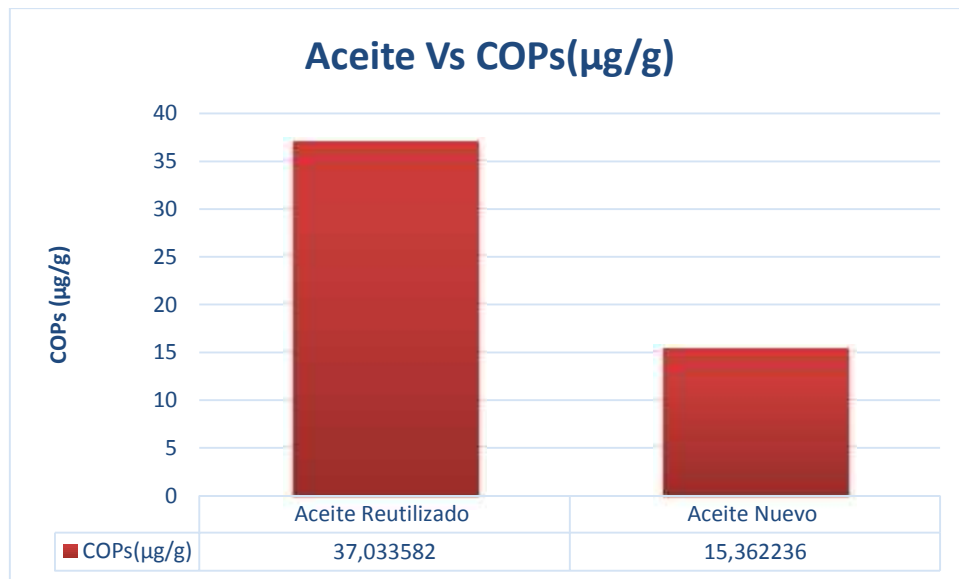


Fuente: Esta Investigación

4.5.1. Descripción del Factor Tipo de Aceite e Interacción Aceite-Tiempo de Fritura

Como se aprecia en el figura 28, la cantidad de COPs totales determinada en el aceite reutilizado (37,033 $\mu\text{g/g}$) es mayor que utilizando aceite vegetal nuevo (15,362 $\mu\text{g/g}$). Una de las razones que puede explicar este comportamiento son las propiedades que presenta el aceite vegetal nuevo, el cual no presenta productos de degradación ni contaminantes. En este estado el aceite vegetal tiene poco poder surfactante, a medida que el aceite se va utilizando en varios ciclos de fritura, sus características fisicoquímicas experimentan cambios, principalmente en lo relacionado al aumento del poder surfactante, permitiendo la absorción del aceite en el alimento; otros cambios que experimenta el aceite en estos procesos son el aumento en los niveles de hidrolisis, oxidación y la presencia de contaminantes¹¹⁵.

Figura 28: Gráfico de Barras Aceite Vs COPs



Fuente: Esta Investigación

En los experimentos realizados, se utilizó como materia prima aceite vegetal, con un tiempo de uso superior a los 15 días (según datos de los expendios). Esto con el fin de simular las condiciones de comercialización de la carne de pollo que se utilizan en los diversos expendios de la ciudad, ya que la reutilización del aceite es una práctica frecuente en el proceso de fritura de la carne de pollo. Además de su

¹¹⁵ TIRADO, D. F.; ACEVEDO, D.; GUZMÁN, L. E. Freído por inmersión de los alimentos. En: ReCiTeIA, 2012, vol. 12, p. 72-80.

uso excesivo, el aceite alcanza una temperatura de fritura, que de acuerdo a los registros realizados en los experimentos superaron los 150°C.

Figura 29: Termocupla para la determinación de Temperatura de freído en el Diseño de Experimentos.



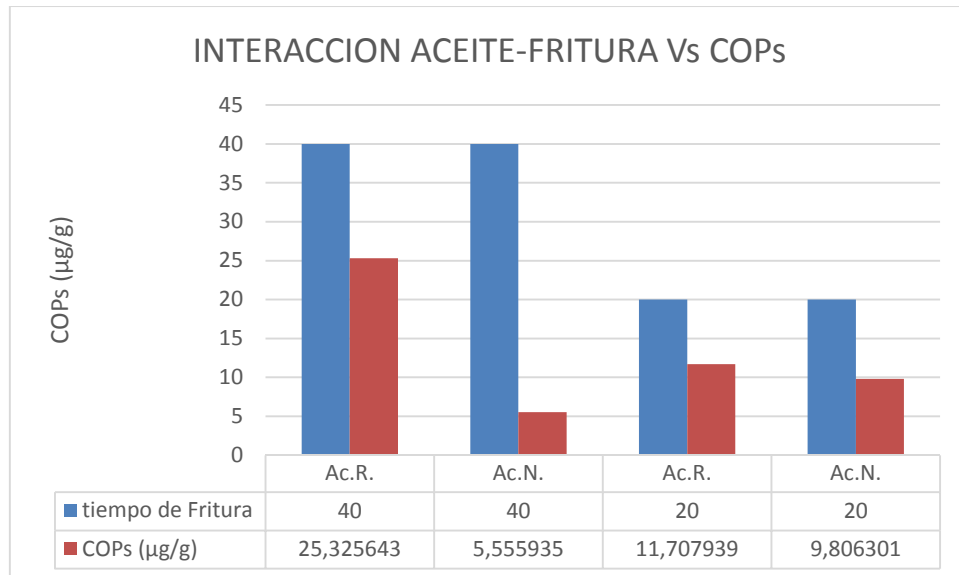
Fuente: Esta Investigación

De acuerdo a lo expuesto en la determinación de óxidos de colesterol en materias primas, (ver sección 4.2.2), el aceite reutilizado presenta una apreciable cantidad de COPs totales (17,63 µg), que de acuerdo con el análisis estadístico realizado a través del Diseño Experimental, es el factor de mayor influencia en la formación de estos compuestos. Sin embargo, es necesario explicar el incremento de estos compuestos en interacción con los factores estudiados en esta investigación. Acorde con el diagrama de Pareto y la tabla ANOVA, la interacción del aceite con el tiempo de fritura, es un factor que influye en la formación de COPs. Esto se puede evidenciar comparando la cantidad de óxidos de colesterol en el aceite reutilizado de materias primas (ver tabla 21), con los determinados en el experimento No 18, cuyo valor es de 37,60 µg de COPs totales

La influencia de la interacción tiempo de fritura y aceite se puede observar en la figura N° 30. Se determinó que la formación de óxidos de colesterol es proporcional al tiempo de exposición del alimento en el aceite y de la misma manera, el incremento de estos compuestos está relacionada con el tipo de aceite utilizado.

De acuerdo a lo reportado por Pokorny y Reblova¹¹⁶, un incremento en el tiempo de la fritura produce una mayor alteración del aceite y del alimento que se frie. Así mismo, el tiempo de calentamiento disminuye la estabilidad del aceite, induciendo la formación de diferentes compuestos de alteración.

Figura 30: Grafico de Barras Interacción Aceite - Fritura Vs COPs



Ac.R: Aceite Reutilizado

Ac.N: Aceite Nuevo

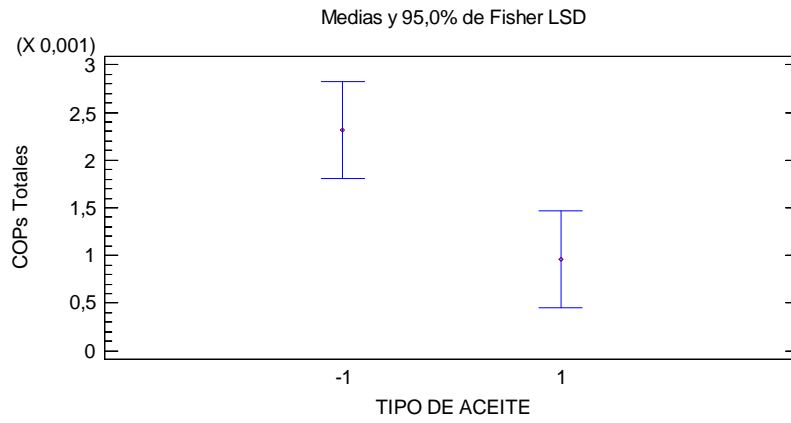
Fuente: Esta Investigación.

Los diagramas de medias al 95% de Fisher, muestran las diferencias estadísticamente significativas entre los valores medios de COPs totales y los factores tipo de aceite y tiempo de fritura. De la misma manera, las pruebas de rangos múltiples indican que existen diferencias significativas en los niveles del tipo de aceite utilizado para realizar los experimentos del análisis.

¹¹⁶ POKORNY, Jan; RÉBLOVÁ, Zuzana. Effect of food components on changes in frying oil. En: Food technology and Biotechnology, 1999, vol. 37, p. 139-144.

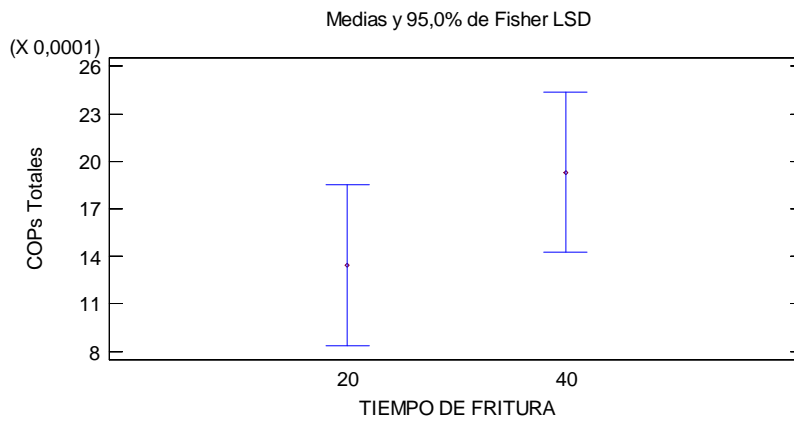
Gráfica 4: Graficas de Medias de Fisher al 95%

A: Tipo de Aceite



Fuente: Esta Investigación

B: Tiempo de Fritura



Fuente: Esta Investigación

Tabla 26: Pruebas de Rangos Múltiples para COPs Totales

A: Tipo de Aceite

Método: 95,0 porcentaje LSD

TIPO DE ACEITE	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Nuevo	0,00096014	0,00034859 3	X
Reutilizado	0,0023146	0,00034859 3	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
-1 - 1	*	0,00135446	0,00101152

* indica una diferencia significativa.

B: Tiempo de Fritura

Método: 95,0 porcentaje LSD

TIEMPO DE FRITURA	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
20	0,00134464	0,000348593	X
40	0,0019301	0,000348593	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
20 - 40		-0,000585459	0,00101152

* indica una diferencia significativa.

Fuente: Esta Investigación

Según Tirado, D¹¹⁷, existen diferentes fases del proceso de fritura cuando se utiliza aceite vegetal. Dichas fases se relacionan con el tiempo de uso al que es sometido el aceite. Se puede describir principalmente la fase de fritura inicial, con un tiempo de 0 minutos, cuya característica es de un aceite nuevo y no presenta productos de degradación, ni contaminantes. En la segunda fase de fritura que dura aproximadamente 5 minutos, se presentan procesos de hidrólisis formando mono y diacilglicéridos. Entre los 5 y 15 minutos de fritura, (fase óptima) la formación de espuma en el aceite favorece los procesos de oxidación; además en esta fase la transmisión de calor es la adecuada para el contacto entre el alimento

¹¹⁷ TIRADO, D.et. al. (2012). Op,cit. p.7.

y el aceite. Posteriormente, en un periodo de tiempo entre los 15 minutos y las 10 horas de calentamiento se comienzan a formar sustancias contaminantes, los niveles de hidrolisis aumentan favoreciendo la oxidación y aumentando la absorción del aceite en el alimento. Por último, una vez transcurridas las 10 horas de fritura el aceite entra en una fase de descarte, es decir, se aumenta la formación de sustancias contaminantes, aumento en el punto de humo del aceite y cambios físicos como olor y color anómalo.¹¹⁸

Una de las características principales en el proceso de fritura es el tipo de calentamiento que se desarrolla durante este proceso; y que esta relacionado con la degradación del aceite. Si el tipo de calentamiento es discontinuo, se produce mayor degradación del aceite respecto al proceso continuo. Este proceso de fritura, se explica por el número de ciclos de calentamiento que puede sufrir el aceite, es así, que repetidos calentamientos y enfriamientos, aceleran su deterioro, durante tiempos prolongados y elevadas temperaturas (170-180°C)¹¹⁹. A temperaturas elevadas, las reacciones oxidativas se desarrollan en la superficie del alimento que se encuentra en contacto con el aire, mientras que durante el enfriamiento, aunque disminuye la velocidad de las mismas, se favorece la entrada de aire, lo cual provoca una mayor formación de hidroperóxidos y radicales libres al calentarse nuevamente¹²⁰.

De acuerdo a lo mencionado anteriormente, se puede evidenciar que en el proceso de comercialización de la carne de pollo en los expendios de la Ciudad, generalmente, debido a la demanda de este alimento, se utilizan tiempos prolongados de fritura, acompañado de calentamientos discontinuos. En general, una pieza de carne de pollo, puede permanecer en el aceite entre 20 a 40 minutos. Lo que induce la formación de COPs

¹¹⁸ ARANGO, N. Análisis de la Calidad del Aceite de Mezclas Vegetales Utilizado en Doce Frituras Sucesivas Empleado para Freír papa Sabanera tipo Francesa. Trabajo de Grado (Nutricionista Dietista). Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Nutrición y Dietética. Colombia (2011), p. 18

¹¹⁹ POKORNY, J.et. al. (1999). Op,cit. p.137.

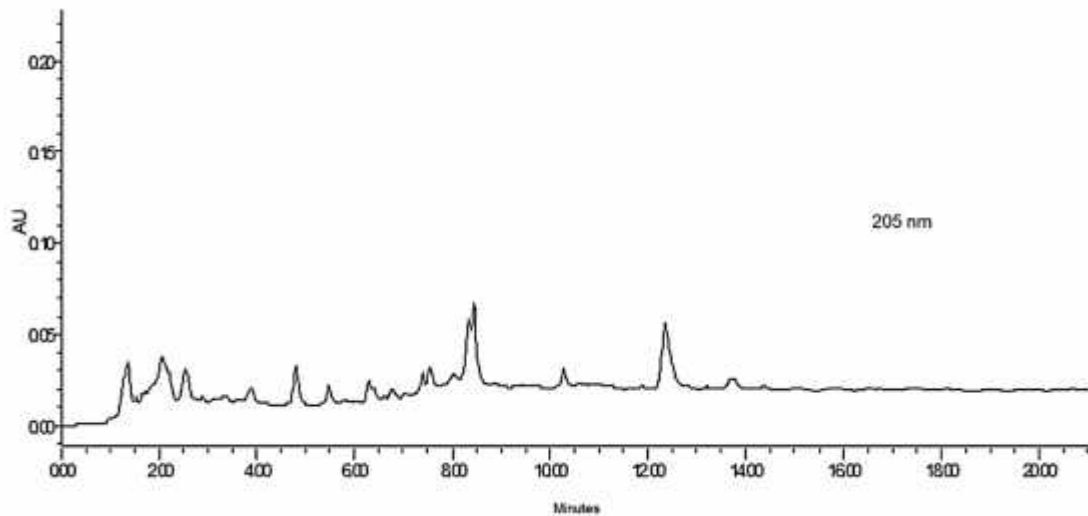
¹²⁰ SANCHEZ-MUNIZ, F. J.; CUESTA, C. Tecnología de la Fritura: Alteraciones de las grasas utilizadas debido al proceso, tipo de grasa culinaria y alimento. Aliment., Equipos y Tecnol, 1991, vol. 3, p. 101-16.

Lo anterior, esta en concordancia con los experimentos realizados en el presente estudio. Como se evidencia en la gráfica de Pareto e interacción aceite-tiempo de fritura, los tiempos de fritura de 40 minutos y el uso de aceite viejo (reusado) registran los mayores valores de COPs.

4.5.2 Contenidos de COPs en Experimentos con Aceite Nuevo

Los contenidos de COPs en los experimentos en los cuales el factor tipo de aceite corresponde al nivel de aceite nuevo es nulo (no detectados), respecto al aceite reutilizado, como se aprecia en la figura 31. En este tipo de análisis la formación de COPs se debe principalmente al contenido de colesterol en las piezas de carne, lo cual sumado a la humedad del alimento influye en la formación de estos compuestos. Ver sección 4.3.

Figura 31: COPs en Aceite Nuevo



Fuente: Esta Investigación.

4.5.3 Contenidos de COPs en Experimentos con el Factor Tipo de Pieza.

De acuerdo a lo descrito en la sección 3.4, se escogieron las piezas de carne pechuga y contramuslo por presentar diferencias en el porcentaje de lípidos. De acuerdo al análisis estadístico, este factor y sus interacciones no presentaron diferencias estadísticamente significativas con la variable de respuesta COPs totales.

Esto se puede apreciar en el gráfico de Pareto y en la tabla ANOVA del diseño experimental. Asimismo, se determinó, que la mayor concentración de óxidos de colesterol, se presentó en los experimentos en los que el tipo de pieza utilizada fue pechuga. (experimentos 12 y 18).

La pechuga presenta una menor cantidad de lípidos totales respecto al contramuslo, y un mayor contenido de humedad. Teniendo en cuenta los valores de humedad descritos en la tabla 24, se puede relacionar este parámetro con la formación de óxidos de colesterol. Según Brannan *et al.*¹²¹, a mayor cantidad de agentes humectantes liberados, se provoca un aumento en la viscosidad, incrementando la cantidad de aceite que se adhiere a la superficie del alimento. Además la tensión interfacial entre el alimento y el aceite disminuye, facilitando de esta manera su absorción. El uso del aceite reutilizado, con cantidades apreciables de COPs, se convierte en un factor que induce a la absorción de estos compuestos en el alimento.

De acuerdo a lo reportado en la literatura¹²², durante el proceso de fritura, los alimentos absorben entre un 5 a 40% en peso de aceite; liberando parte de sus lípidos en el aceite de fritura. Durante este proceso, el agua liberada por el alimento, en forma de vapor, causa la hidrólisis de los lípidos, dando origen a ácidos grasos libres, los cuales son más propensos a la oxidación.

¹²¹ BRANNAN, Robert G., *et al.* Influence of ingredients that reduce oil absorption during immersion frying of battered and breaded foods. En: European journal of lipid science and technology, 2014, vol. 116, no 3, p. 240-254.

¹²² MONTES, N. *et al.* (2016). *Op.cit.* p.88

4.5.4 Contenidos de COPs en Experimentos con el Factor Tiempo de Venta.

Considerando el factor tiempo de venta de la carne de pollo, el cual se incluyó en el desarrollo del diseño experimental, no presentó diferencias estadísticamente significativas. Esto se evidencia en la gráfica de Pareto y en la tabla ANOVA, en donde el valor p de esta variable es 0.05.

El almacenamiento de la carne una vez frita, no influyó en la formación de COPs. La formación de estos tóxicos, se presenta durante el proceso de preparación del alimento, en el que se involucran reacciones de oxidación lipídica, siendo el oxígeno, la luz y la temperatura precursores principales de los fenómenos oxidativos en la carne.

4.5.5. Análisis de Correlaciones

Los coeficientes de correlación lineal de Pearson presentan para las variables relacionadas valores cercanos a la unidad. Entre los valores de los coeficientes de Pearson que se determinaron son: Humedad (-0.1090) y Lípidos Totales (-0.2128). Estos valores presentan correlaciones negativas respecto a los Oxidos de Colesterol totales. Los valores p 0,05 indican correlaciones significativamente diferentes de cero, con un nivel de confianza del 95,0%. Para estos experimentos las variables Humedad y Lípidos totales presentan estas características.

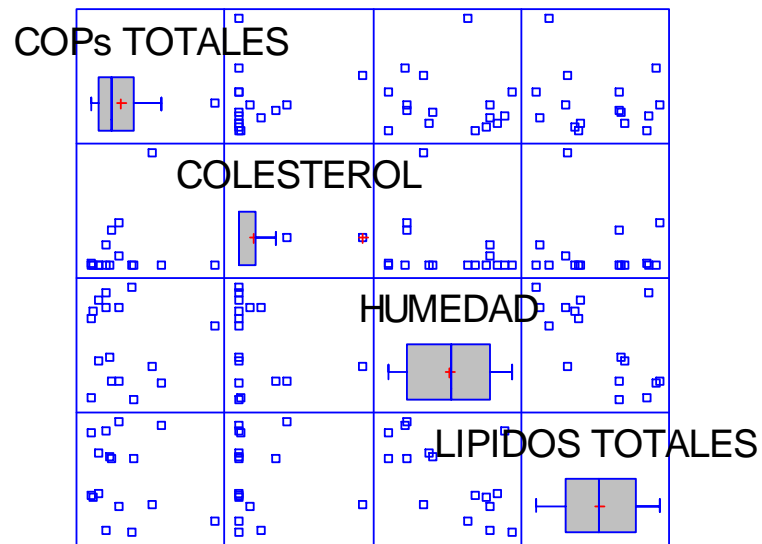
Tabla 27: Matriz de Correlaciones de Parametros Bromatologicos.

CORRELACIONES	COPs TOTALES	COLESTEROL	LIPIDOS TOTALES	HUMEDAD
COPs TOTALES		0,1877 0,4865	-0,2128 0,4288	-0,1090 0,6877
COLESTEROL	0,1877 0,4865		-0,0950 0,7264	-0,2633 0,3245
LIPIDOS TOTALES	-0,2128 0,4288	-0,0950 0,7264		-0,6510 0,0063
HUMEDAD	-0,1090 0,6877	-0,2633 0,3245	-0,6510 0,0063	

Fuente: Esta Investigación

El Correspondiente diagrama de dispersión de la matriz de correlación de los factores, cuya correlación es significativa se presenta en el grafico 5

Grafica 5: Diagrama de Dispersión de la Matriz



Fuente: Esta Investigación

Por otra parte el coeficiente de relación de Pearson, para el par de variables COPs totales y tipo de aceite, presentaron valores de 0,0100, indicando que entre estas variables existe correlación estadísticamente significativa.

En el gráfico 6 se presenta una alta dispersión de los datos en la matriz de correlación, lo cual está acorde a lo expuesto en la tabla de matriz de correlaciones.

Tabla 28: Matriz de Correlaciones de Los Factores Estudiados.

CORRELACIONES	COPs TOTALES	TIEMPO DE FRITURA	TIEMPO DE VENTA	TIPO DE ACEITE
COPs TOTALES		0,1940 0,2873	-0,1955 0,2837	-0,4488 0,0100
TIEMPO DE FRITURA	0,1940 0,2873		0,0000 1,0000	0,0000 1,0000
TIEMPO DE VENTA	-0,1955 0,2837	0,0000 1,0000		0,0000 1,0000
TIPO DE ACEITE	-0,4488 0,0100	0,0000 1,0000	0,0000 1,0000	
TIPO DE PIEZA	0,0457 0,8037	0,0000 1,0000	0,0000 1,0000	0,0000 1,0000

Fuente: Esta Investigación

Grafica 6: Diagrama de Dispersión de la Matriz



Fuente: Esta Investigación

4.5.6. Análisis del Contenido de COPs Detectados en Piezas Fritas de Carne de Pollo.

El 25-OH se encontró en todos los experimentos realizados, siendo el que presenta la mayor concentración en las muestras analizadas para la determinación de los factores, que influyen en la formación de estos compuestos. El experimento 18, presentó la concentración más alta (4,88 µg/g). Como se mencionó en el 4.4 y 4.5.1, los factores asociados a la formación de estos compuestos en los que intervienen los factores de uso de aceite reutilizado y humedad de la pieza, contribuyen al aumento en la concentración del 25-OH.

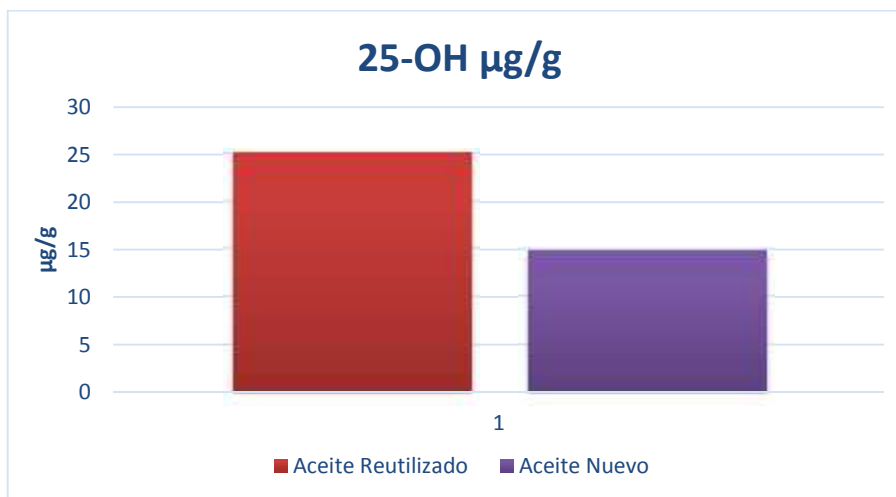
Existen diferentes referencias respecto a la formación de este compuesto en muestras de carne de pollo. Según lo reportado por Mariutti *et al*¹²³, el 25-OH, fue encontrado en muestras sometidas a tratamiento térmico y posterior almacenamiento (0.10-0.14 µg/g); Galvin *et al*¹²⁴, reporta la presencia de 25-OH en muestras de pollo inmediatamente después de cocinado. Estas muestras fueron refrigeradas durante 12 días y posteriormente se determinó la concentración de COPs. La concentración de 25-OH se incrementa conforme transcurre el número de días.

Es importante precisar, que el análisis de óxidos de colesterol en alimentos, en donde el uso continuo de aceite, que forma parte del proceso de preparación, no ha sido abordado como un factor que influye en la formación de estos compuestos. Como se aprecia en la figura 32, la concentración de 25-OH en aceite reutilizado es mayor en comparación con los experimentos, en donde se utilizó aceite nuevo. Lo anterior puede explicarse de acuerdo a lo mencionado en el numeral 4.4, en donde, intervienen los procesos de intercambio de materia con el porcentaje de agua del alimento, y sumado al uso prolongado que se da al aceite, induce a la presencia de COPs en el aceite reutilizado los cuales se absorben en el alimento. De igual manera, la presencia de este compuesto se relaciona con el contenido de colesterol en el alimento, como fuente primaria para la formación de COPs.

¹²³ MARIUTTI, Lilian Regina Barros; BRAGAGNOLO, Neura. A oxidação lipídica em carne de frango e o impacto da adição de sálvia (*Salvia officinalis*, L.) e de alho (*Allium sativum*, L.) como antioxidantes naturais. En: Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso), 2009, vol. 68, no 1, p. 1-11.

¹²⁴ GALVIN, K.; MORRISSEY, P. A.; BUCKLEY, D. J. Cholesterol oxides in processed chicken muscle as influenced by dietary α -tocopherol supplementation. En: Meat science, 1998, vol. 48, no 1-2, p. 1-9.

Figura 32: Grafico de Barras de la concentración de 25-OH Vs Tipo de Aceite

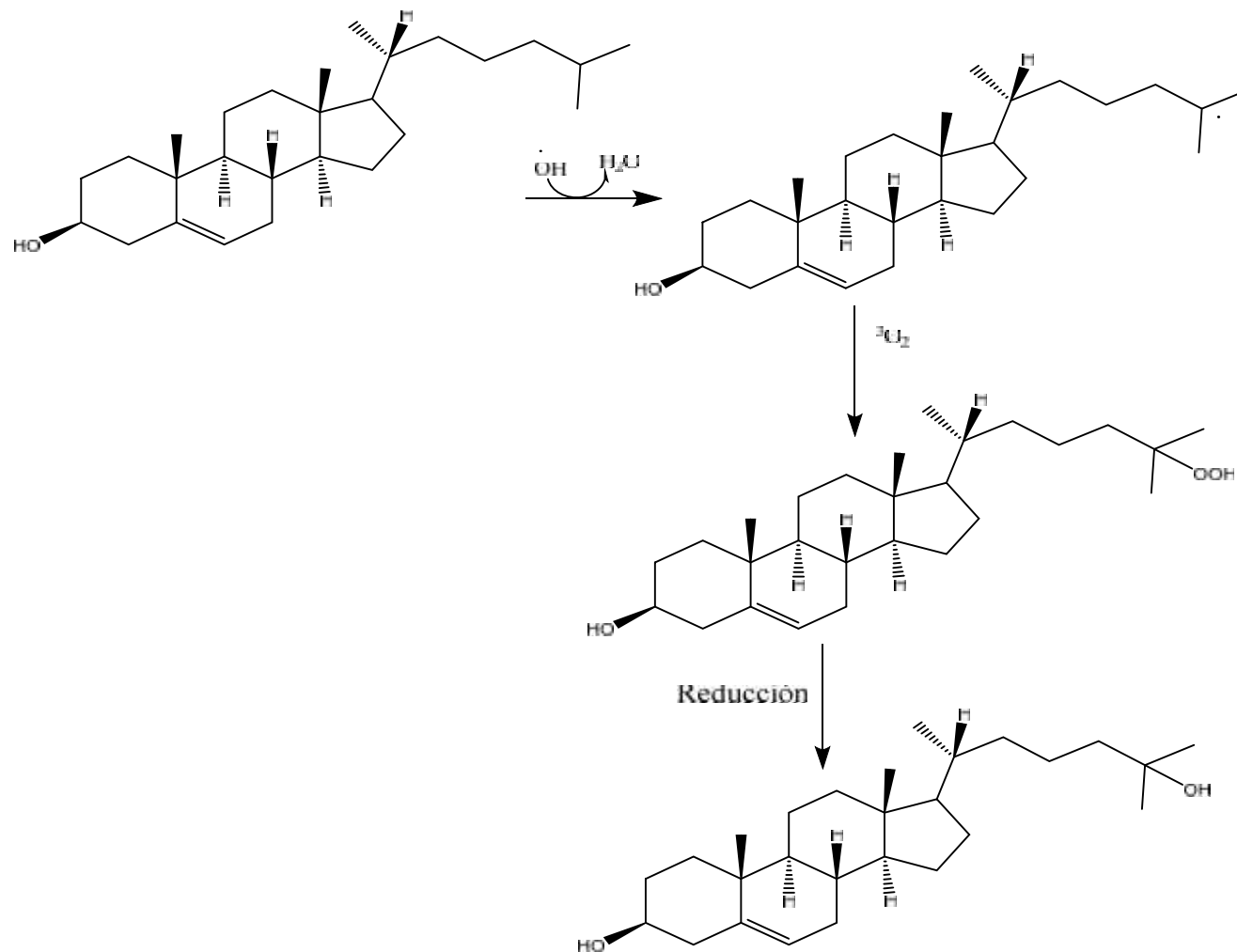


Fuente: Esta Investigación

El oxisterol se forma vía radical libre en presencia de oxígeno, siendo la temperatura un factor que influye en la formación de COPs. Según Guardiola¹²⁵ los primeros radicales libres originados en la oxidación del colesterol, se forman en las posiciones 7 y 25, desencadenando la serie de reacciones que conllevan al origen de los óxidos de Colesterol. El mecanismo de formación del oxisterol 25-OH se ilustra en la figura 33.

¹²⁵ GUARDIOLA Francesc, et al. Cholesterol and Phytosterol Oxidation Products: En: Analysis, Occurrence, and Biological Effects. Illinois: AOCS Press Champaign, 2002. p. 1-387. ISBN: 1-893997-34-0

Figura 33: Mecanismo de Formación del 25-OH



Fuente: BARNABA C, et al. (2016)¹²⁶

¹²⁶ BARNABA, Carlo, et al. Cholesterol photo-oxidation: A chemical reaction network for kinetic modeling. Steroids, 2016, vol. 116, p. 52-59.

Por otra parte, la presencia de 7 -OH en la carne de pollo, se presentó en mayor concentración en el experimento 27 (Aceite Reutilizado, 40 min) con una concentración de 4.20 µg/g. Al respecto trabajos realizados por Mariutti *et al*¹²⁷ reportan la presencia de 7 -Hidroxicolesterol después del tratamiento térmico y posterior almacenamiento de carne de pollo. Sander *et al*¹²⁸, analizaron los óxidos de Colesterol en carne de pollo almacenado al vacío; reportando la presencia de 7 -Hidroxicolesterol en 4 muestras, cuya concentración total fue de 6,0 µg/g.

La formación de 7 -OH es un proceso no enzimático, donde la molécula de colesterol es atacada por especies reactivas de oxígeno (ROS) abstrayendo un hidrogeno alílico de la posición 7; el radical formado reacciona con el oxígeno originando los hidroperóxidos, los cuales son inestables a altas temperaturas. La descomposición térmica de estos hidroperóxidos da lugar a la formación de 7 y 7 - hidroxicolesterol^{129,130}. Lo anterior se evidencia mediante el mecanismo de reacción ilustrado en la figura 34.

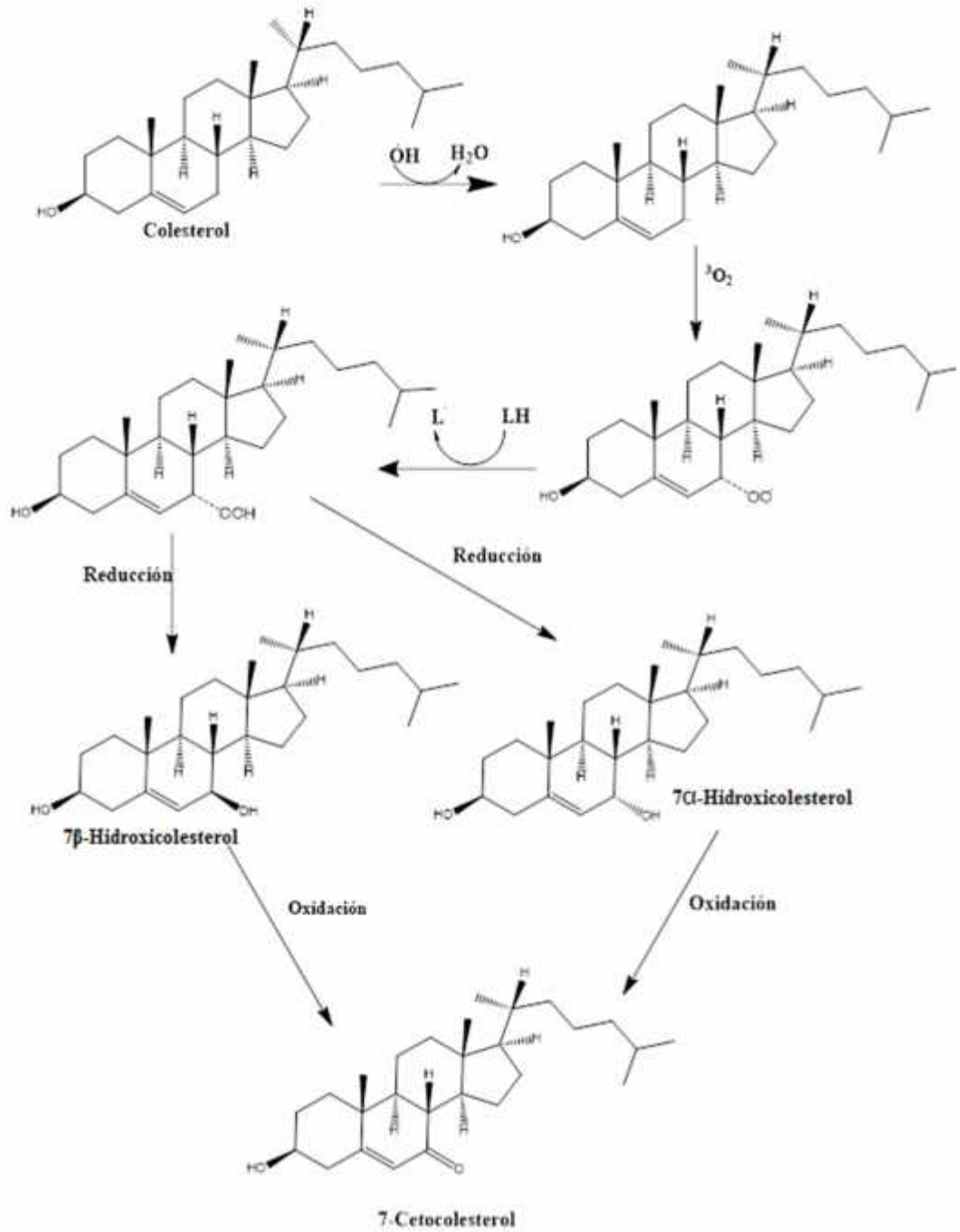
¹²⁷ MARIUTTI, L.et. al. (2009). Op,cit. p.4

¹²⁸ SANDER, B. D., et al. Quantification of cholesterol oxidation products in a variety of foods. En: Journal of Food Protection, 1989, vol. 52, no 2, p. 109-114.

¹²⁹ SAMPAIO, G. S. Ocorrência de óxido de colesterol e análise do perfil lipídico em camarão salgado-seco. Tesis de Doctorado. En: Universidad de São Paulo. Brasil (2004), p.4.

¹³⁰ ARRAZOLA, Ana, et al. Oxysterols: a world to explore. En: Food and Chemical Toxicology, 2010, vol. 48, no 12, p. 3289-3303.

Figura 34: Mecanismo de Formación del 7-OH y 7-Ceto.



Fuente: BARNABA C, et al. (2016)¹³¹

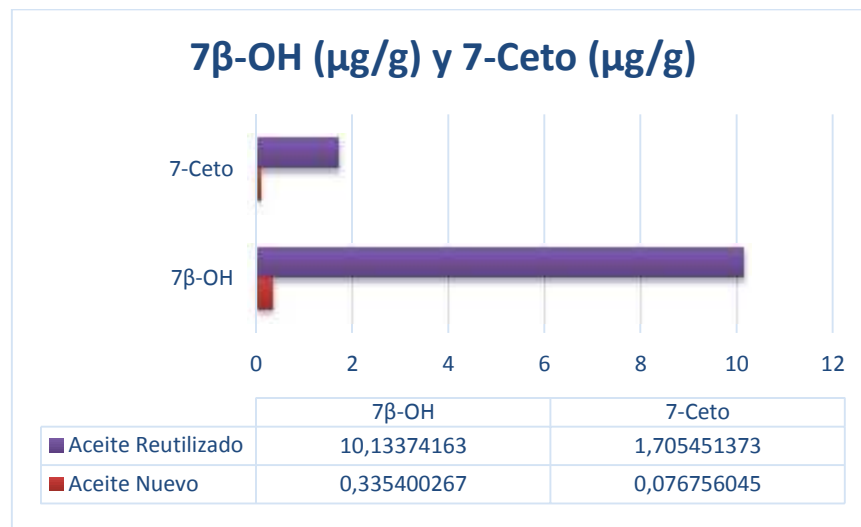
¹³¹ BARNABA, C.et. al. (2016). Op,cit. p.57.

Siguiendo la cadena de reacciones, la oxidación de 7 y 7 hidroxicolesterol origina el 7-Cetocolesterol como producto final de la reacción.

El 7-Cetocolesterol fue determinado en un 25% de los análisis realizados, siendo el factor aceite reutilizado el que presentó la mayor concentración de este compuesto. Cuando se empleó aceite reutilizado y tiempos de fritura de 40 min (experimento 1) se presentó una mayor concentración (0.88 µg/g). Diferentes autores reportan la presencia de 7-Ceto en muestras de pollo; Galvin *et al*¹³² estudiaron la presencia de 7-Ceto en muestras sometidas a almacenamiento en un transcurso de 6 a 12 días. En el día 12 detectaron la formación de 7-Ceto. Asimismo, Zubillaga y maerker¹³³, determinaron 7-Cetocolesterol en carne de pollo cruda, posteriormente la concentración incremento con el calentamiento. Mariutti *et al*¹³⁴, analizaron los principales óxidos de colesterol en pollo crudo y posterior calentamiento y almacenado, reportando 7-Cetocolesterol en todo el proceso de preparación.

La siguiente figura ilustra la influencia que tiene el factor tipo de aceite con la formación de los óxidos de colesterol 7 -OH y 7-Ceto.

Figura 35: Gráfico de Barras de la concentración de 7 -OH y 7-Ceto Vs Tipo de Aceite



Fuente: Esta Investigación

¹³² GALVIN, K.et. al. (1998). Op,cit. p.5.

¹³³ ZUBILLAGA, M. P.; MAERKER, G. Quantification of three cholesterol oxidation products in raw meat and chicken. *En: Journal of food science*, 1991, vol. 56, n° 5, p. 1194-1196.

¹³⁴ MARIUTTI, L.et. al. (2009). Op,cit. p.5.

4.5.7. Análisis de Componentes Principales (PCA)

Se realizó un análisis de componentes principales teniendo en cuenta las variables estudiadas que influyen en la formación de óxidos de colesterol descritas en el diseño experimental.

Los resultados de los autovalores y de las ecuaciones se describen a continuación:

Tabla 29: Análisis de Componentes Principales

Componente		Porcentaje de	Porcentaje
Número	Eigenvalor	Varianza	Acumulado
COPs totales	1,52858	30,572	30,572
Ta	1,0	20,000	50,572
Tf	1,0	20,000	70,572
Tv	1,0	20,000	90,572
Tp	0,471416	9,428	100,000

Fuente: Esta Investigación

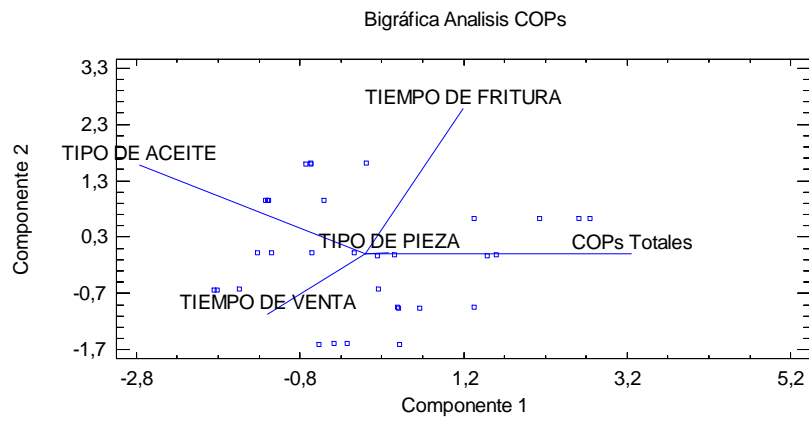
Existe un componente con un Eigenvalor mayor a 1 correspondiente a la variable COPs totales, 3 de los componentes presentan Eigenvalores iguales a 1 (tiempo de fritura, tiempo de venta, y tipo de aceite).

La ecuación del componente 1 es la siguiente:

$$0,707107 * \text{COPs totales} + 0,259537 * \text{Tf} - 0,261479 * \text{Tv} - 0,600438 * \text{Ta} + 0,0611832 * \text{Tp}$$

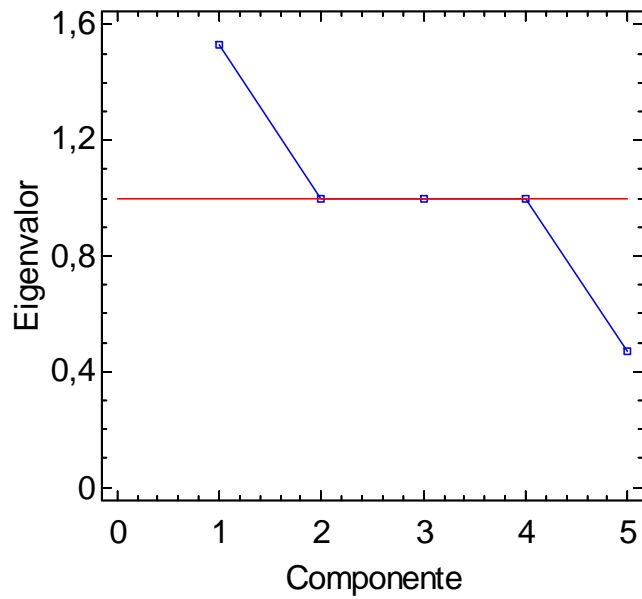
En la bigráfica se puede observar que los componentes tiempos de fritura y tipo de aceite presentan una mayor incidencia en la formación de los óxidos de colesterol, lo que coincide con lo descrito en el análisis de varianza del diseño experimental.

Grafica 7: Bigráfica Análisis de COPs



Fuente: Esta Investigación

Grafica 8: Gráfica de sedimentación

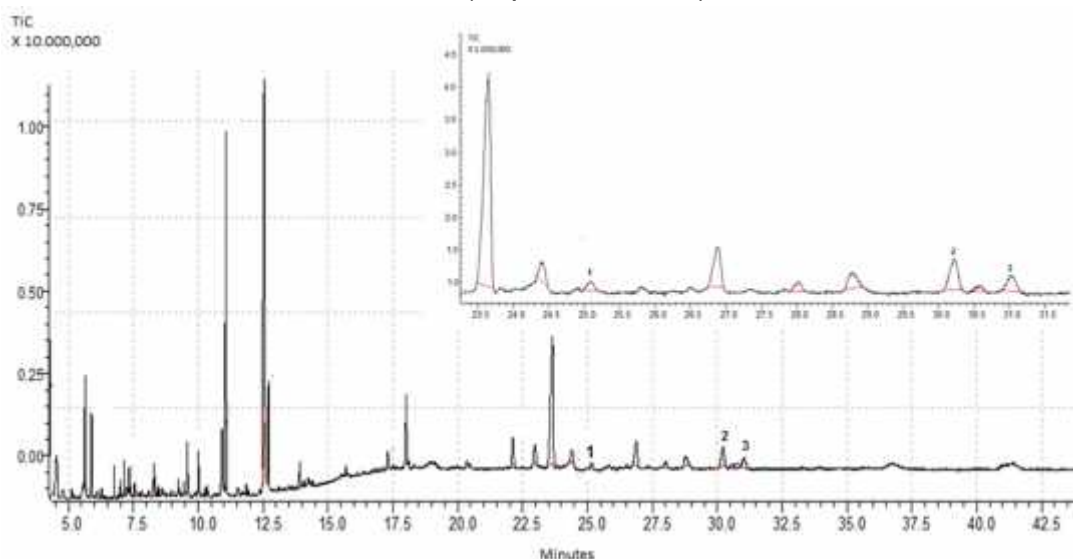


Fuente: Esta Investigación

4.5.8 Análisis por Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas GC-MS

Con el propósito de realizar un análisis confirmatorio de los COPs identificados en el diseño experimental, se realizó el análisis por GC-MS de acuerdo a la metodología descrita en la sección 3.11. Para la identificación de los TMS-derivados de los COPs en las muestras se emplearon los espectros de masas experimentales con referencia a la bases de datos NIST y Wiley. Además se emplearon soluciones estándar de estos compuestos analizadas bajo las mismas condiciones operacionales. La tabla N° 30 registra los COPs detectados en el experimento N° 18, el cual presento la mayor cantidad de oxiesteroles totales. Se identificaron los TMS-derivados de los COPs 25-OH, 7 -OH y 7-Ceto.

Figura 36: Cromatograma de Iones Totales Muestra Diseño Experimental (Experimento 18).



Fuente: Esta Investigación

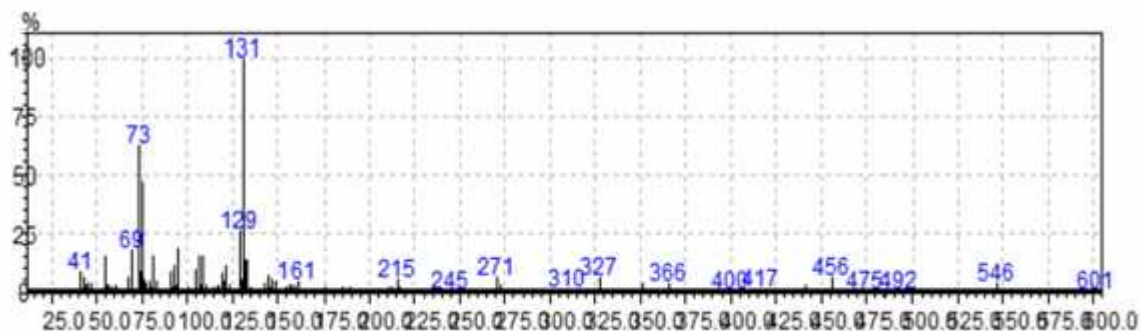
Tabla 30: Identificación de los TMS-derivados de COPs por GC-MS. Experimento N° 18

Pico N°	tR (minutos)	Compuesto	Iones fragmento EI
1	25,05	7 -OH	546, 456 (100), 441, 129, 73
2	30,21	25-OH	546, 456, 366, 327, 271, 131 (100), 73
3	31, 10	7-Ceto	472, 382,367, 264, 129, 73(100)

Fuente: Esta Investigación

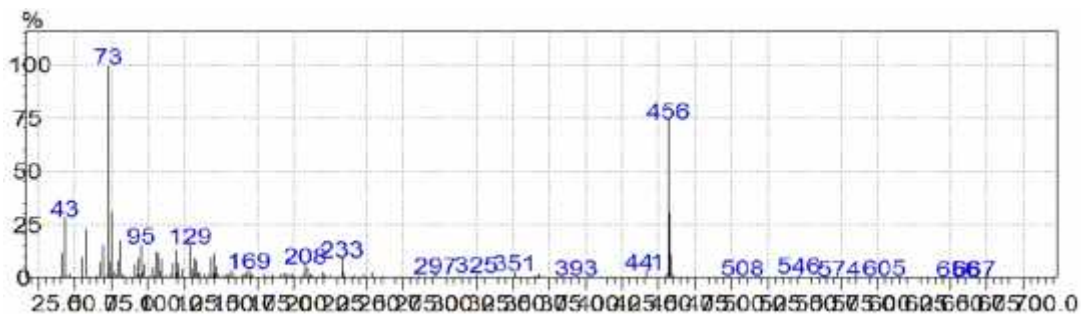
Figura 37: Espectros de masas Experimentales de los COPs identificados en la muestra del experimento 18.

A. 25-OH



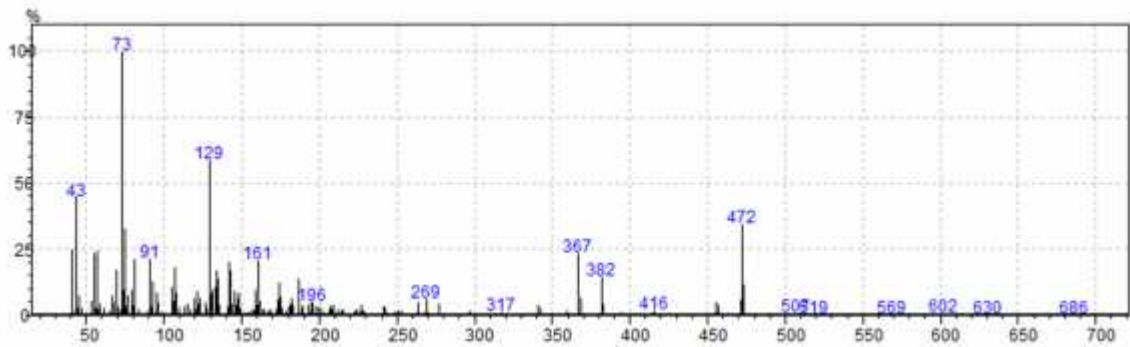
Fuente: Esta Investigación

B. 7 -OH



Fuente: Esta Investigación

C. 7-Ceto



Fuente: Esta Investigación

4.6. Análisis de Muestras Comercializadas en la Ciudad de Pasto.

De acuerdo a lo planteado en la sección 3.10, se realizó un muestreo totalmente aleatorio para determinar los niveles de óxidos de colesterol presentes en la carne de pollo tipo *broaster*, comercializada en la Ciudad de Pasto. Se tomaron un total de 19 muestras, de diferentes puntos de la ciudad, con el propósito de que las muestras sean representativas de toda el área de estudio. La adquisición de las muestras se realizó en los sectores Norte, Sur, Centro, Oriente y Occidente. Los resultados de los análisis se registran en la tabla 31.

Tabla 31: Análisis de Muestras,

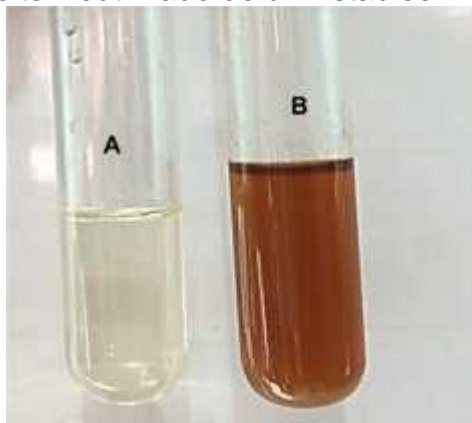
Muestra	Sector	COPs totales (µg/g)
1	Norte	5.60
2	Norte	1.72
3	Sur	1.51
4	Centro	9.87
5	Centro	0.50
6	Sur	7.21
7	Norte	1.72
8	Norte	1.23
9	Sur	0.31
10	Centro	2.73
11	Centro	2.15
12	Sur	0.70
13	Nor-Occidente	12.40
14	Sur-Oriente	27.55
15	Occidente	3.52
16	Sur	12.52
17	Centro	3.77
18	Oriente	3.50
19	Sur	12.72

Fuente: Esta Investigación.

En las 19 muestras analizadas se detectaron concentraciones apreciables de óxidos de colesterol, lo que indica que durante la preparación de este alimento, en el proceso de comercialización, diversos factores, entre los que se encuentran el tipo de aceite, tiempo de fritura y tipo de pieza están involucrados en la formación de estos compuestos.

Lo anterior se pudo evidenciar en el proceso de adquisición de las muestras, donde en la mayoría de los puntos de venta, se apreció gran cantidad de vapores generados en las freidoras, lo que indica altas temperaturas en el proceso de fritura (ver sección 4.5.1) y cantidades apreciables de piezas de carne de pollo en las freidoras. Lo anterior, es común en los puntos de venta, por tratarse de un alimento de alto consumo en la Ciudad de Pasto. Además, por el aspecto que presentaba el aceite en la mayoría de los puntos, se pudo observar que el re-uso del mismo es una práctica común en la comercialización de este alimento.

Figura 38: Aceite Reutilizado de un Establecimiento Comercial



A: Aceite Nuevo; B: Aceite Reutilizado

Fuente: Esta Investigación

De acuerdo a los valores determinados en las muestras, el promedio de óxidos de colesterol total es de 5,85 $\mu\text{g/g}$. La concentración más alta de COPs se determinó en una muestra tomada en el sector Sur-Oriental, con un valor de 27,55 $\mu\text{g/g}$. Como se evidencia en la tabla 31, los niveles de COPs determinados presentaron diversos valores. Los procedimientos generales en el proceso de preparación y comercialización de las muestras son diferentes en cada punto de venta, es decir, se emplean diferentes tiempos de fritura, permanencia de la pieza de carne de pollo en la freidora, temperaturas de fritura, frecuencia del re-uso del aceite y diferentes periodos de venta.

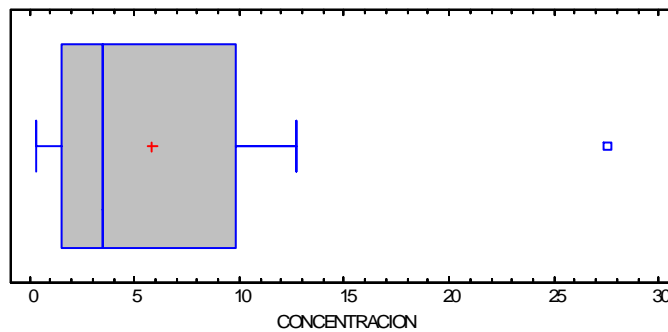
Para determinar el grado de dispersión de los datos se procedió a realizar un análisis de varianza del contenido de COPs totales en las muestras analizadas en la Ciudad de Pasto. En la comparación de las muestras, el resultado del análisis ANOVA, se obtuvo un valor-p 0.05 lo que indica que existen diferencias estadísticamente significativas en las muestras. Esto concuerda con los resultados experimentales, ya que como se mencionó anteriormente, el proceso de fritura de la carne de pollo tiene diferentes factores en el proceso de preparación, los cuales difieren entre los puntos de venta o expendios. La dispersión de las concentraciones de óxidos de colesterol se puede apreciar en los gráficos de caja y bigotes y de dispersión.

Tabla 32: Tabla ANOVA Análisis de Muestras

Fuente	Suma de Cuadrados	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	223,768	9,80	0,0035
Intra grupos	822,226		
Total (Corr.)	1045,99		

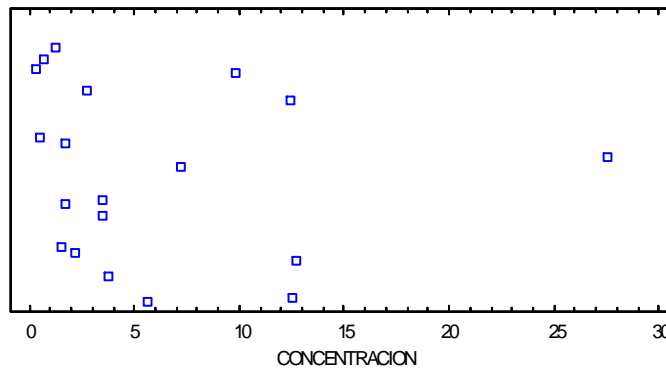
Fuente: Esta Investigación.

Gráfica 9: Gráfico de Caja y Bigotes



Fuente: Esta Investigación.

Gráfica 10: Gráfico de Dispersión

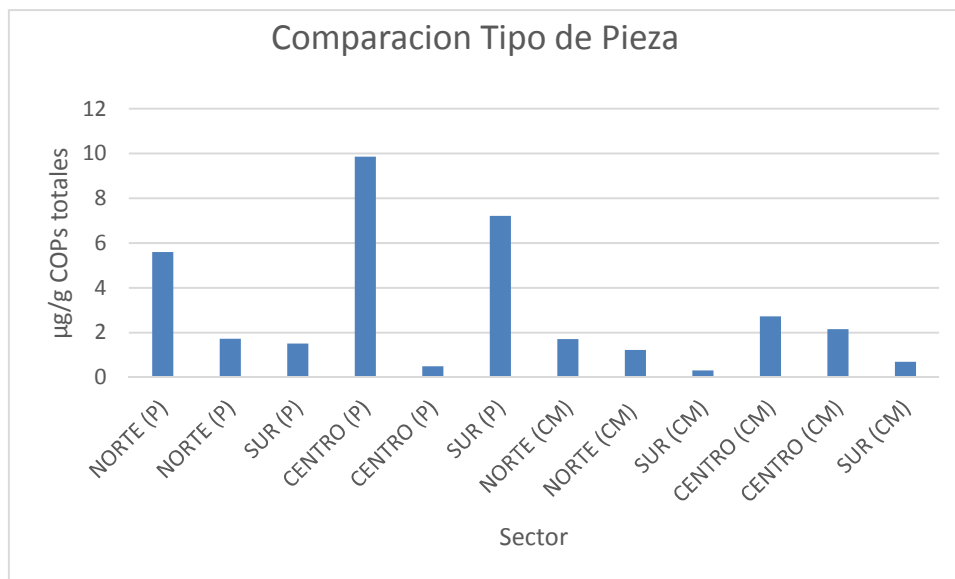


Fuente: Esta Investigación.

De las muestras analizadas en los puntos de venta, se tomaron en algunos expendios, piezas de pechuga y contramuslo para evaluar sus diferencias en la concentración de COPs totales.

La pieza pechuga tomada en un punto de venta del sector centro, presentó la mayor concentración de COPs totales. Como se describió en el análisis de los factores que influyen en la formación de estos compuestos, (ver sección 4.4) la pieza de pechuga presenta mayor porcentaje de agua y por ende, mayor absorción de compuestos tóxicos presentes en el aceite de fritura. El gráfico 11 ilustra la concentración de COPs en los dos tipos de pieza.

Gráfica 11: Gráfico de Barras Comparación de Tipo de Pieza



CM: contramuslo
P: pechuga

Fuente: Esta Investigación

Los valores determinados en los tipos de pieza pechuga y contramuslo, presentaron valores promedio de 4,40 µg/g y 1.48 µg/g respectivamente. La mayor concentración de COPs totales está representada por el oxiesterol 25-OH, presente en la totalidad de las muestras. El porcentaje de 25-OH en los COPs totales fue del 85.71%.

Es de resaltar que en los expendios de venta de carne de pollo, las condiciones de almacenamiento, conservación y preparación de la carne de pollo, contribuyen a la oxidación inicial del colesterol presente en la muestra. Lo anterior, es concordante con lo reportado en la literatura¹³⁵, en la cual, se describe la influencia de los factores asociados a la conservación del alimento, y la pérdida en la cadena del frío, como causas de la presencia de este compuesto.

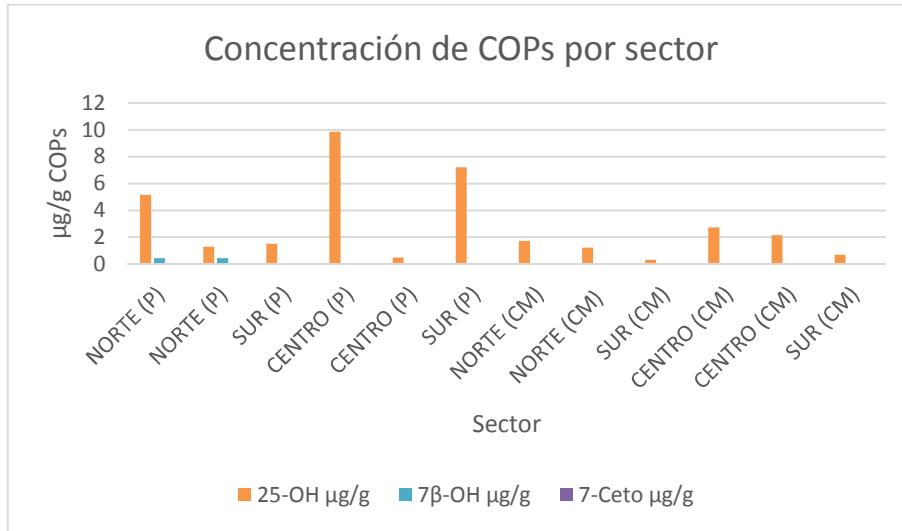
De acuerdo a lo explicado en el análisis de los factores, sección 4.5.6, el re-uso del aceite y la humedad de la pieza, contribuyen al aumento en la concentración de oxiesteroles en las muestras de carne.

La menor concentración de 25-OH se presentó en la pieza contramuslo, adquirida en el sector sur; según lo descrito en el apartado 4.4, el porcentaje de agua en la pieza contramuslo es inferior que en la pieza pechuga lo que conlleva a una menor interacción con los compuestos presentes en el aceite utilizado en la fritura.

La gráfica 12 registra los valores determinados en las muestras analizadas de acuerdo al tipo de pieza, con sus respectivas diferencias en el contenido de COPs totales.

¹³⁵ CONCHILLO, A. et. al. (2005). Op,Cit. p. 143.

Grafica 12: Gráfico de Barras Concentración de COPs por pieza en cada Sector



Fuente: Esta Investigación

En la siguiente tabla, se registran los valores de humedad de las muestras, en donde se determina la diferencia de este parámetro en relación al tipo de pieza, y su influencia en la formación del 25-OH, de acuerdo a lo explicado anteriormente.

Tabla 33: Humedad de las piezas de pollo en cada sector

Sector	Muestra	% Agua
Centro	Pechuga	67.03
Centro	Contramuslo	20.59
Sur	Pechuga	61.54
Sur	Contramuslo	26.48
Nor-Oriente	Pechuga	63.53
Centro	Contramuslo	17.48
Nor-Occidente	Pechuga	65.54
Centro	Pechuga	55.93
Sur	Contramuslo	18.10
Sur-Oriente	Pechuga	63.53

Fuente: Esta Investigación

4.6.1 Análisis de COPs en Muestras Comercializadas en la Ciudad de Pasto por GC-MS.

Se analizaron las muestras que presentaron la mayor presencia de oxiesteroles de estudio por GC-MS, de acuerdo a lo planteado en la metodología descrita en la sección 3.11. La figura N° 39 ilustra el cromatograma de iones totales de una muestra de la zona norte. En el análisis se identificaron los TMS-derivados de los COPs 25-OH y 7 -OH.

Figura 39: Cromatograma de iones totales Muestra Zona Norte

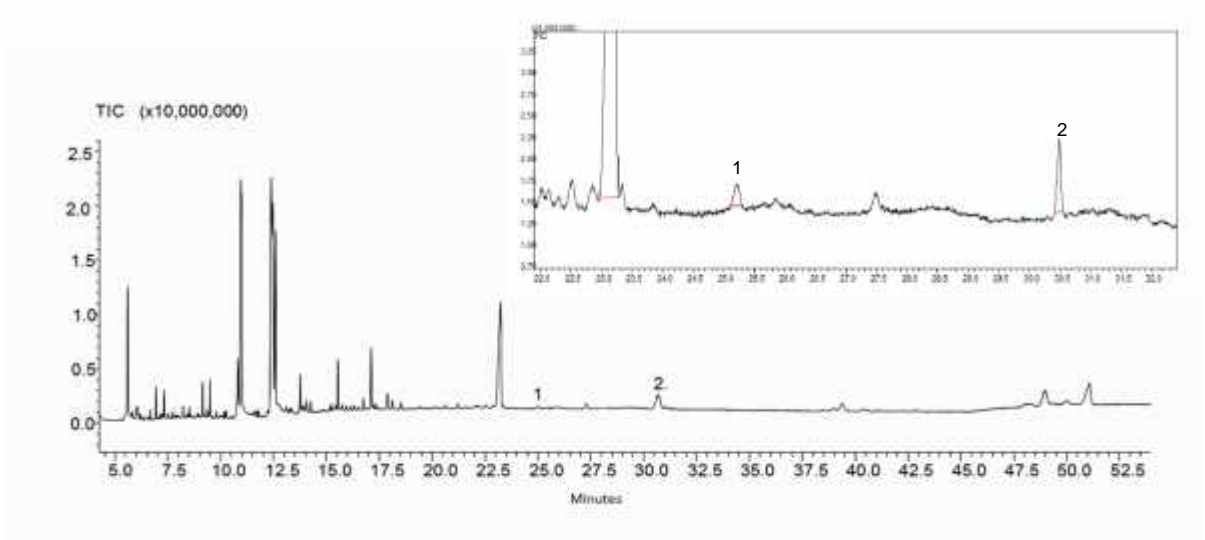


Tabla 34: Identificación de los TMS-derivados de COPs por GC-MS. Muestra Zona Norte

Pico No	tR (minutos)	Compuesto	Iones fragmento EI
1	25,01	7 -OH	546, 456 (100), 441, 129, 73
2	30,54	25-OH	546, 456, 366, 327, 271, 131 (100), 73

Fuente: Esta Investigación

4.7. Transformación Térmica del Colesterol en sus Oxidos.

4.7.1. Transformación del Colesterol

De acuerdo a la metodología descrita en el apartado 3.13, se evaluó la degradación del colesterol a diferentes tratamientos térmicos y en diferentes tiempos. Los resultados de estos experimentos se presentan a continuación.

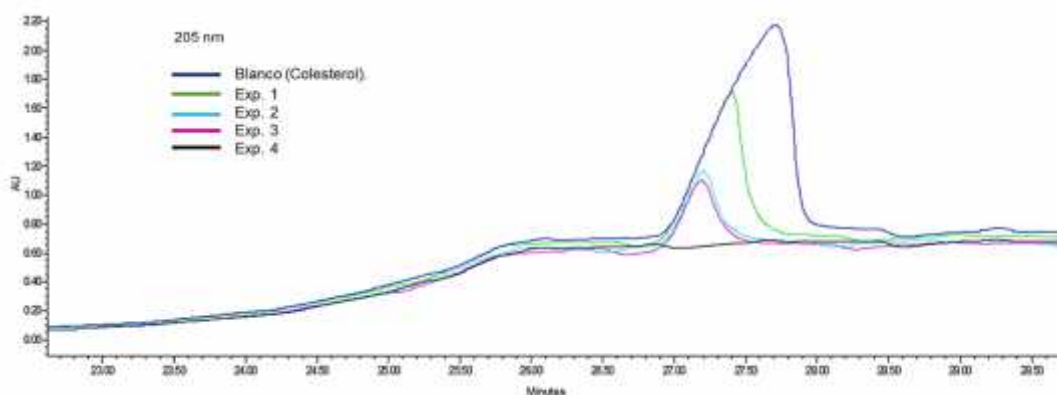
Tabla 35: Resultados de Experimentos Degradación Colesterol

Experimentos Degradación Colesterol				
N°	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Concentración ppm	% Degradación Colesterol
	Blanco		10000	0
1	120	30	4605	53.945
2	150	60	1697	83.024
3	180	120	1587	84.123
4	220	180	367	96.327

Fuente: Esta Investigación

Los resultados de la tabla, indican los porcentajes de degradación de acuerdo a los experimentos realizados. Los experimentos 3 y 4, con temperaturas altas y tiempos prolongados, fueron los que presentaron los mayores porcentajes de degradación de Colesterol. En el tratamiento térmico realizado, la concentración de colesterol disminuye conforme aumenta la temperatura y el tiempo. El cromatograma registra la disminución en el área del pico de colesterol de acuerdo a los experimentos realizados.

Figura 40: Cromatograma Degradación del Colesterol de acuerdo a Temperatura y Tiempo.



Fuente: Esta Investigación

La degradación del colesterol fue de 96.32% a temperatura de 220°C y tiempo 180 min. Bajo estas condiciones, se identificaron como compuestos de degradación, los COPs 25-OH y 7 -OH. A condiciones de 180°C y 120 min, se determinaron de la misma manera los oxisteroles anteriormente mencionados. En relación a la concentración, el experimento 3 presentó las mayores concentraciones de 25-OH y 7 -OH, pese a que, las condiciones de tiempo y temperatura fueron inferiores al experimento 4. El 7-cetocolesterol no fue detectado. La tabla N° 36 y los histogramas ilustran la formación de los COPs en los experimentos realizados.

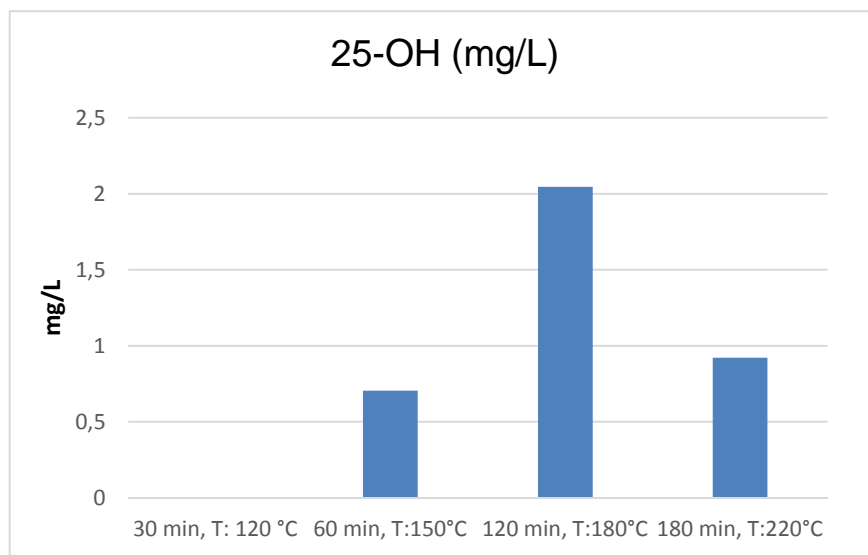
Tabla 36: Formación de COPs

EXPERIMENTOS				
N°	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Concentración (µg/L)	
			25-OH	7 -OH
1	120	30	ND	ND
2	150	60	0,705	ND
3	180	120	2,045	2,610
4	220	180	0,922	2,425

ND: no detectado

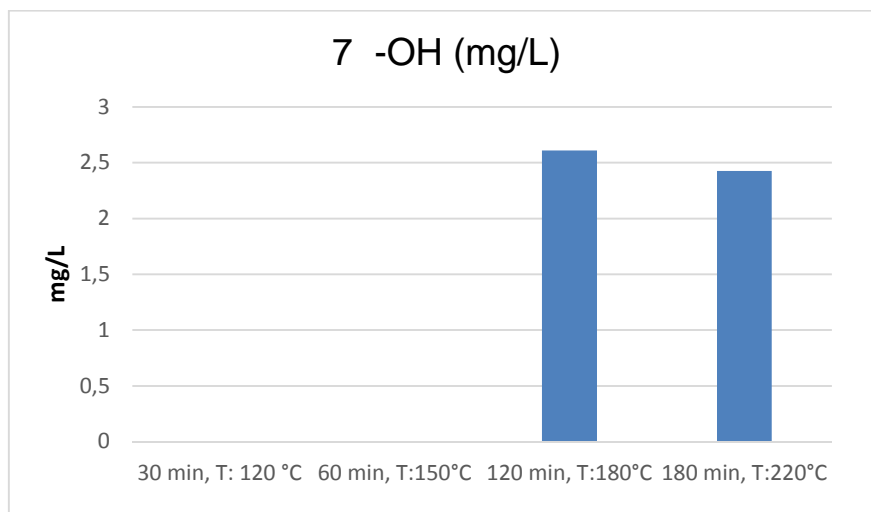
Fuente: Esta Investigación

Figura 41: Diagrama de Barras formación de 25-OH



Fuente: Esta Investigación

Figura 42: Diagrama de Barras formación de 7 -OH



Fuente: Esta Investigación

Entre las investigaciones relacionadas con la transformación del colesterol se encuentran principalmente el modelo propuesto por Derewiaka et al.¹³⁶ En este trabajo, se reporta que la mayor concentración de oxisteroles se presenta a una temperatura de 180°C, determinando el 7 -Hidroxicolesterol, 25-Hidroxicolesterol, 5 ,6 -Epoxicolesterol y 7-Cetocolesterol. Estudios realizados por Kim y Nawar¹³⁷, determinaron la estabilidad del colesterol frente a diferentes temperaturas. Las pérdidas de colesterol en un tiempo de 30 min a 150°C, 20 y 40 min a 180°C fueron de 75.6%, 71.7% y 83.6% respectivamente.

Como se menciona en la sección de metodología, el presente modelo, tiene como objetivo establecer la temperatura y tiempo a los cuales se presenta una mayor degradación del colesterol y formación de sus respectivos óxidos; Cabe resaltar que en los experimentos, no se tienen en cuenta otros factores y variables, (procesos de preparación y forma de cocción), que por su sinergia, influyen en la formación de oxisteroles y en la degradación de la molécula de estudio.

Teniendo en cuenta el experimento 3, en donde se presentó la mayor concentración de COPs, se determinó el comportamiento de un antioxidante natural en relación con la disminución de óxidos de colesterol formados en este proceso. Lo anterior se fundamenta en el uso de este tipo de antioxidantes como condimentos en las recetas tradicionales empleadas para la preparación de alimentos; y con ello, esbozar una posible alternativa para esta problemática relacionada con la salud.

4.7.2. Efecto Antioxidante del Extracto Etanólico de Romero (*Rosmarinus officinalis*)

La oxidación lipídica promueve modificaciones de los lípidos y las proteínas del músculo, afectando las propiedades organolépticas y nutricionales de la carne y de los derivados cárnicos¹³⁸. Factores como el oxígeno en presencia de altas temperaturas, radicales libres, luz, etc. Inducen a la oxidación de lípidos desencadenando una serie de reacciones en cadena explicadas en el apartado

¹³⁶ DEREWIKA, D.; MOLI SKA, E. Cholesterol transformations during heat treatment. En: Food chemistry, 2015, vol. 171, p. 233-240.

¹³⁷ .KIM, S. K.; NAWAR, W. W. Parameters influencing cholesterol oxidation. En: Lipids, 1993, vol. 28, no 10, p. 917-922.

¹³⁸ MAYA, Y.; MOLINA, D.; VARGAS, J. Oxidación lipídica y antioxidantes naturales en derivados cárnicos. En: Journal of Engineering and Technology, 2016, vol. 2, no 2, p. 50-66.

2.1.4. Diversos estudios apuntan que la oxidación lipídica puede ser minimizada o controlada mediante el uso de antioxidantes^{139,140}.

El uso de antioxidantes naturales ha sido de importante interés científico, debido a que los antioxidantes sintéticos tienen como desventaja su volatilidad y descomposición a altas temperaturas¹⁴¹. La mayoría de los antioxidantes naturales evaluados para productos cárnicos son extraídos especialmente de plantas aromáticas, medicinales o especias, que contienen compuestos químicos que exhiben propiedades antioxidantes, tales como polifenoles, flavonoides, vitamina C y vitamina E¹⁴².

Dentro de los condimentos de mayor uso en las recetas tradicionales, se encuentra el romero; material vegetal el cual ha sido diversamente estudiado por sus propiedades antioxidantes. Entre estos estudios, se encuentra lo relacionado al efecto antioxidante que presenta sus extractos etanolicos el cual contiene compuestos aromáticos como los monoterpenos oxigenados (linalool, verbenona, acetato de isobornilo, etc.), y diterpenos fenólicos, con buen potencial antioxidante, como carnosol, ácido carnósico, rosmanol, epirosmanol,¹⁴³.

Con el propósito de minimizar la oxidación del colesterol en sus óxidos, se realizó un análisis a diferentes muestras que se analizaron en el presente trabajo. Para este experimento, se tuvo en cuenta la temperatura de 180°C de acuerdo a los resultados de la transformación térmica del colesterol (sección 4.7.1). La tabla 37, describe las muestras analizadas con la concentración de colesterol antes y después de adicionar el extracto de romero.

¹³⁹ ARMENTEROS, M., et al. Empleo de antioxidantes naturales en productos cárnicos. En: Eurocarne, 2012, vol. 207, p. 63-73.

¹⁴⁰ ROJANO, Benjamín, et al. Oxidación de lípidos y antioxidantes. Medellín. UNAL.1997. 59 p.

¹⁴¹ VALENCIA, Idoia, et al. Enhancement of the nutritional status and quality of fresh pork sausages following the addition of linseed oil, fish oil and natural antioxidants. En: Meat Science, 2008, vol. 80, no 4, p. 1046-1054.

¹⁴² MAYA, Y.et. al. (2016). Op,cit. p.56.

¹⁴³ MARTINELLO, M. A.; PRAMPARO, M. Poder antioxidante de extractos de romero concentrados por destilación molecular. Información tecnológica, 2005, vol. 16, no 5, p. 17-20.

Tabla 37: Efecto Antioxidante en la formación de COPs

Exp	Muestra	Concentración Muestra (mg/L)	Volumen Muestra	Concentración Extracto (ppm)	Volumen Extracto (µL)	Concentración Inicial (µg/L)	Concentración Final (µg/L)
1	Colesterol	10				795,05	
2	Colesterol + Romero		20	200	20		786,17
3	Pollo crudo		100			24,54	
4	Pollo crudo + Romero		100	200	20		7,38
5	Aceite Nuevo		100			ND	
6	Aceite Nuevo + Romero		100	200	20		ND
7	Aceite Reutilizado		100			ND	
8	Aceite Reutilizado + Romero		100	200	20		ND

ND: no detectado

Fuente: Esta Investigación

La influencia del extracto etanólico de romero en la degradación del colesterol se evidencia en la tabla 37, en donde se aprecia disminución en la concentración de esta molécula (1.11%).

A las condiciones de temperatura en las cuales se realizaron los experimentos es evidente que el colesterol haya presentado degradación. Así mismo, estas condiciones influyen en la formación de óxidos de colesterol, debido a la susceptibilidad de esta molécula respecto a la temperatura y presencia de oxígeno. Es importante destacar, que la concentración de COPs disminuyó en los experimentos en los cuales se adicionó extracto etanólico de romero. Estos resultados se indican en la tabla 38 y figura 42.

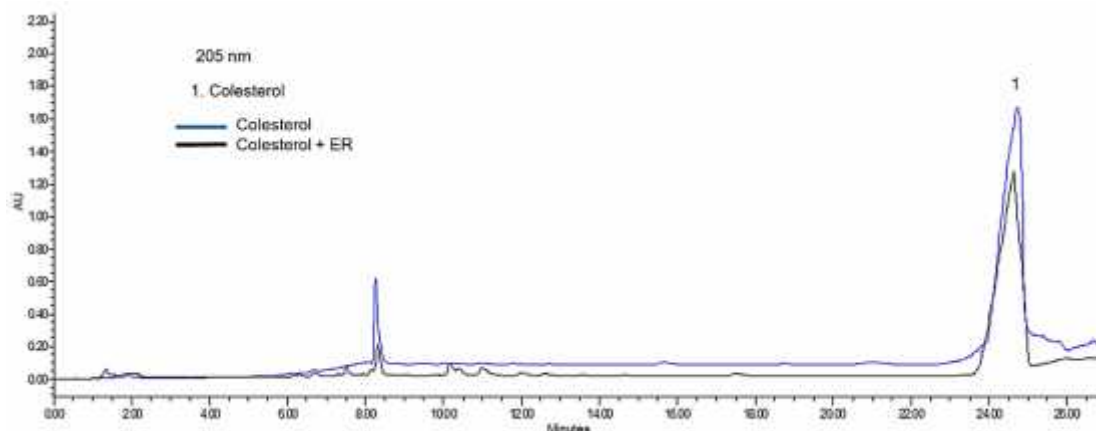
Tabla 38: Resultados Efecto Antioxidante en Patrón de Colesterol

COLESTEROL			COLESTEROL +ROMERO		
CONCENTRACION INICIAL (µg/L)			CONCENTRACION FINAL (µg/L)		
25-OH	7 -OH	7-Ceto	25-OH	7 -OH	7-Ceto
0,965	ND	ND	0,684	ND	ND

ND: no detectado

Fuente: Esta Investigación

Figura 43: Cromatograma de Comparación patrón de Colesterol con patrón de colesterol con Romero



Fuente: Esta Investigación

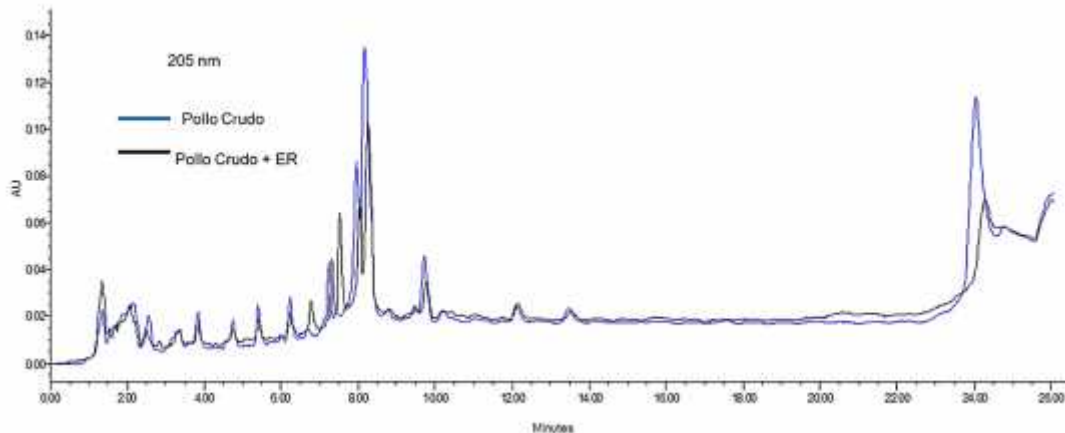
El análisis de pollo crudo se describió en el apartado 4.3.2, reportando la presencia de 25-OH en pechuga y contramuslo; mauritti *et al*¹⁴⁴, indican la presencia de 7 -OH, 7-Ceto y 25-OH en pollo crudo atribuyendo a la conservación del producto antes del procesamiento. En el experimento N° 2, sometido a tratamiento térmico, en el cual se utilizó extracto etanólico de romero, se presentó una disminución en la concentración de COPs identificados, como se evidencia en la tabla 39.

Tabla 39: Resultados Efecto Antioxidante en Pollo Crudo

POLLO CRUDO			POLLO CRUDO +ROMERO		
CONCENTRACION INICIAL (µg/L)			CONCENTRACION FINAL (µg/L)		
25-OH	7 -OH	7-Ceto	25-OH	7 -OH	7-Ceto
8,782	3,638	1,739	7,167	ND	1,587

Fuente: Esta Investigación

Figura 44: Cromatograma de Comparación pollo crudo y pollo crudo con extracto de romero



Fuente: Esta Investigación

¹⁴⁴ MARIUTTI, L.et. al. (2009). Op,cit. p.5.

El análisis del factor aceite nuevo en los contenidos de óxidos de colesterol, se estudió en el apartado 4.5.2, en el cual se asocia el contenido de COPs a las piezas de carne. En la tabla 40 y figura 45 no se detectan la presencia de COPs.

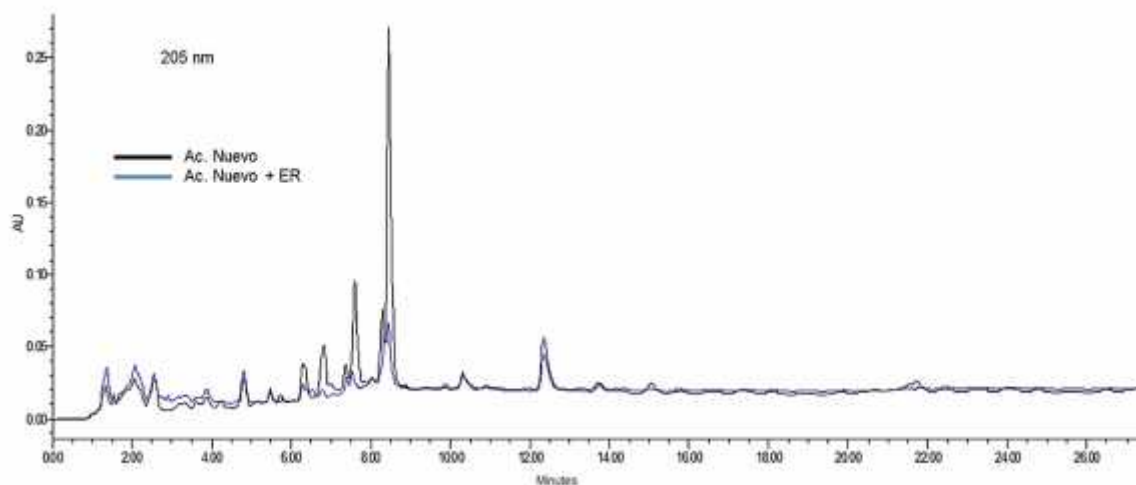
Tabla 40: Resultados Efecto Antioxidante en Aceite Nuevo

ACEITE NUEVO			ACEITE NUEVO + ROMERO		
CONCENTRACION INICIAL (µg/L)			CONCENTRACION FINAL (µg/L)		
25-OH	7 -OH	7-Ceto	25-OH	7 -OH	7-Ceto
ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND: no detectado

Fuente: Esta Investigación

Figura 45: Cromatograma de Comparación Aceite Nuevo y Aceite Nuevo con Romero



Fuente: Esta Investigación

Las diversas fases por las que atraviesa el aceite van incrementando su deterioro y con ello la acumulación de compuestos propios del alimento, lo cual fue explicado en el apartado 4.4. La acumulación de oxiesteroles en aceite reutilizado implica el aumento en la concentración de estos compuestos en los alimentos que son sometidos a los procesos de fritura. La utilización del extracto etanólico de romero redujo la concentración de 25-OH en un 18%. Los resultados se presentan a continuación.

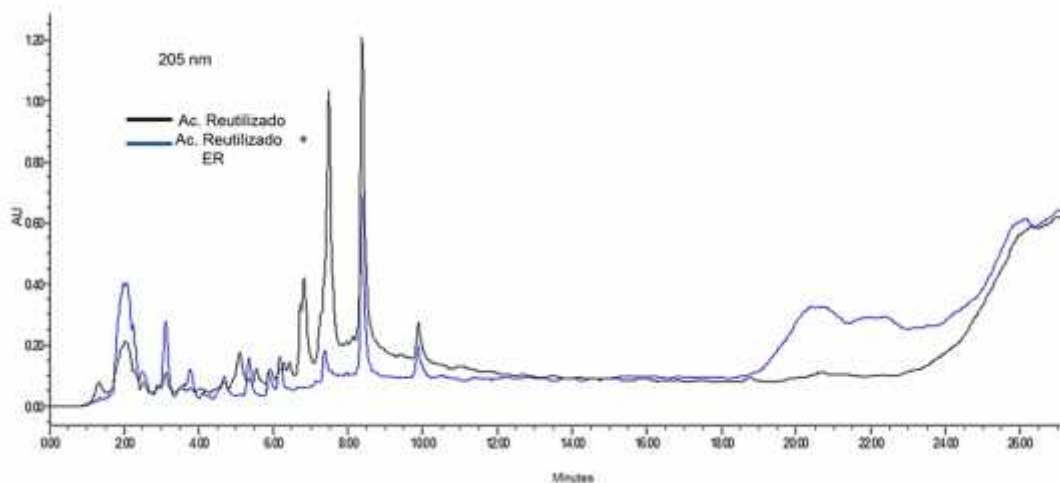
Tabla 41: Resultados Efecto Antioxidante en Aceite Reutilizado.

ACEITE REUTILIZADO			ACEITE REUTILIZADO + ROMERO		
CONCENTRACION INICIAL (µg/L)			CONCENTRACION FINAL (µg/L)		
25-OH	7 -OH	7-Ceto	25-OH	7 -OH	7-Ceto
1,927	ND	ND	1,588	ND	ND

ND: no detectado

Fuente: Esta Investigación

Figura 46: Cromatograma de Comparación Aceite Reutilizado y Aceite Reutilizado con Romero.



Fuente: Esta Investigación

El efecto del extracto etanolico de romero en los análisis de muestras presento resultados satisfactorios en la acción antioxidante de oxiesteroles. En los citados experimentos se pudo evidenciar que el uso de este extracto redujo la concentración total de COPs. Los valores experimentales obtenidos indican una reducción de 0.281µg/L de COPs en la transformación del colesterol. En los que se refiere a las materias primas utilizadas en esta investigación, una reducción de 5.407 µg/L y 0.339 µg/L de COPs se presentó la pieza de carne de pollo crudo y en el aceite reutilizado respectivamente.

El análisis de antioxidantes en patrones de colesterol y el tratamiento térmico para su oxidación fue estudiado por Barriuso *et al.*¹⁴⁵. En esta investigación, se analizó la influencia de *Melissa officinalis* en la formación de COPs. En 10 minutos de calentamiento en la muestra control, la formación de COPs totales fue de 94 µg por mg de colesterol inicial, mientras que en la muestra tratada con el extracto no se detectó la presencia de COPs, obteniendo la mejor efectividad del extracto antioxidante.

¹⁴⁵ BARRIUSO, B.*et. al.* (2015). *Op,cit.* p.136

CONCLUSIONES

1. La evaluación del método de análisis de óxidos de colesterol por HPLC-PDA presento resultados satisfactorios en cuanto a las figuras de mérito determinadas. La linealidad presentó coeficientes de correlación mayores a 0.999 para los tres óxidos de colesterol estudiados. Los límites de detección y cuantificación fueron adecuados para la matriz de estudio (0.8 a 1.8 $\mu\text{g/L}$). El método fue preciso con RSD % inferiores al 5% para el área y al 1% para los tiempos de retención. La exactitud del método fue adecuada con valores de porcentaje de recuperación superiores al 90% para los analitos de estudio.
2. Los factores que presentaron mayor influencia en la formación de óxidos de colesterol en los procesos de preparación de carne de pollo a la *broaster* fueron el tipo de aceite y la interacción entre el tipo de aceite y tiempo de fritura. Estos factores presentaron valores p inferiores a 0.05 indicando que presentan diferencias estadísticamente significativas.
3. La mayor cantidad de COPs se presentó cuando se empleó aceite reutilizado y tiempos de fritura de 40 minutos. Bajo estas condiciones experimentales, se obtuvieron valores de 4.250 y 5.311 $\mu\text{g/g}$ de COPs totales identificados.
4. La mayor concentración de oxiesteroles se presentó con el tipo de pieza pechuga, la cual reporto el mayor contenido de agua (44-62%). Se estableció que la humedad de la pieza tienen una mayor influencia en la formación de estos compuestos debido a la interacción existente entre el aceite utilizado y el contenido de agua en las muestras.
5. El 25-Hidroxicolesterol fue el compuesto detectado en todos los experimentos analizados. La concentración más alta determinada fue 4.88 $\mu\text{g/g}$. La formación y aumento en la concentración de este compuesto está asociada al uso de aceite reutilizado y el contenido de humedad en la pieza. Así mismo se identificaron los oxiesteroles 7 -Hidroxicolesterol y 7-Cetocolesterol, principalmente cuando se utilizó aceite reusado y tiempos de fritura de 40 min.
6. En las muestras analizadas en los puntos de comercialización de carne de pollo tipo *broaster* se determinaron contenidos de COPs totales en valores que van de 0.5-27.5 $\mu\text{g/g}$. En todas las muestras analizadas fueron detectados estos compuestos, principalmente el 25-Hidroxicolesterol. El análisis de varianza indicó que existen diferencias estadísticamente significativas en las muestras de estudio, dado a las características de cada punto de venta en los procesos de preparación y comercialización.

7. Se evaluó la degradación de una solución de colesterol a diferentes temperaturas en diferentes tiempos. El 96.32% de degradación se presentó a 220°C y 180 min. La mayor cantidad de óxidos de colesterol identificados se dieron a las condiciones de 180°C y 120 min. Los COPs detectados fueron 25-Hidroxicolesterol y 7 -Hidroxicolesterol.

RECOMENDACIONES

1. Realizar el presente estudio en otro tipo de alimentos de consumo diario utilizando la metodología de SPE con cartuchos C18 y HPLC-PDA.
2. Con el propósito de continuar con el seguimiento al factor del re-uso del aceite para la fritura, se recomienda realizar un estudio en donde se analicen otros compuestos formados, como hidroperóxidos, nitrosaminas y acrilaminas en los procesos de preparación de alimentos utilizando este tipo de materias primas
3. Aplicar metodologías de extracción de lípidos en los alimentos, como el método ASE para minimizar el empleo de solventes orgánicos tóxicos.
4. Continuar con el estudio de antioxidantes naturales aplicados a diversas matrices con el fin de contrarrestar o minimizar el origen de compuestos tóxicos propios del aceite o de productos cárnicos.
5. Mediante los resultados obtenidos, promover programas educativos y de vigilancia para crear conciencia en todas las personas involucradas en la cadena de comercialización de este alimento, para minimizar prácticas inadecuadas de preparación de estos productos, principalmente lo correspondiente al uso excesivo de aceite reutilizado.

BIBLIOGRAFIA

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. S., et al. Further investigations of mutagenic cholesterol preparations. En: Food and Chemical Toxicology, 1982, vol. 20, no 1, p. 35-41.

ANSCOMBE F. The Validity of Comparative Experiments. En: Journal Royal of the Statistical Society (1947). Vol. 61, p.181 -211.

ARANGO, N. Análisis de la Calidad del Aceite de Mezclas Vegetales Utilizado en Doce Frituras Sucesivas Empleado para Freír papa Sabanera tipo Francesa. Trabajo de Grado (Nutricionista Dietista). Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Nutrición y Dietética. Colombia (2011), p. 18

Argüeso R., Díaz JL., Díaz JA., Rodríguez A., Castro M., Diz-Lois F. Lípidos, colesterol y lipoproteínas. En: Galicia Clin 2011; 72 (Supl. 1): S7-S17

ARMENTEROS, M., et al. Empleo de antioxidantes naturales en productos cárnicos. En: Eurocarne, 2012, vol. 207, p. 63-73.

ARRAZOLA, Ana, et al. Oxysterols: a world to explore. En: Food and Chemical Toxicology, 2010, vol. 48, no 12, p. 3289-3303.

ARTURO F. Estudio Químico de los Alcaloides Presentes en las Hojas de Yerbamora (*solanum nigrum l.*), Originaria de los Municipios de Pasto y Chachagüí. Trabajo de Grado (Químico). Universidad de Nariño. Facultad de ciencias Exactas y Naturales. Departamento de Química. Colombia (2017). p. 44-46

ASTRUC, M., et al. DNA and cholesterol biosynthesis in synchronized embryonic rat fibroblasts: II. Effects of sterol biosynthesis inhibitors on cell division. En: Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 1983, vol. 763, no 1, p. 11-18.

BARNABA, Carlo, et al. Cholesterol photo-oxidation: A chemical reaction network for kinetic modeling. En: Steroids, 2016, vol. 116, p. 52-59.

BARRIUSO, Blanca, et al. Role of *Melissa officinalis* in cholesterol oxidation: Antioxidant effect in model systems and application in beef patties. En: Food Research International, 2015, vol. 69, p. 133-140.

BARTLETT M. Properties of Sufficiency and Statistical Tests. En: Proceedings of the Royal Society of London (1937). vol. 160, p. 268-282.

BRANNAN, Robert G., et al. Influence of ingredients that reduce oil absorption during immersion frying of battered and breaded foods. En: European journal of lipid science and technology, 2014, vol. 116, no 3, p. 240-254.

BRENNA Thomas. et al. Grasas y ácidos grasos en nutrición humana. Granada. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Fundación Iberoamericana de Nutrición (FINUT). 2012. 204 p. no. 91 ISBN 978-92-5-3067336

BROWN M., Goldstein J. Suppression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity and inhibition of Growth of human fibroblasts by 7-Ketocholesterol En: The Journal of Biological Chemistry (1974). Vol. 249, p. 7306-7314.

CAREY, Martin C.; SMALL, Donald M.; BLISS, Charles M. Lipid digestion and absorption. En: Annual Review of Physiology, 1983, vol. 45, no 1, p. 651-677.

CARVAJAL, S. G. Valor nutricional de la carne de res, cerdo y pollo.En: Corporación de fomento ganadero, 2001.

CONCHILLO, Ana; ANSORENA, Diana; ASTIASARÁN, Iciar. Intensity of lipid oxidation and formation of cholesterol oxidation products during frozen storage of raw and cooked chicken. En: Journal of the Science of Food and Agriculture, 2005, vol. 85, no 1, p. 141-146.

DANESHFAR, A.; KHEZELI, T.; LOTFI, H. J. Determination of cholesterol in food samples using dispersive liquid-liquid microextraction followed by HPLC-UV. En: Journal of Chromatography B, 2009, vol. 877, no 4, p. 456-460.

DELGADO, Wilman. ¿Por qué se enrancian las grasas y aceites? En: Revista Palmas, 2004, vol. 25, n° 2, p. 35-43.

DEPERU.COM. Cortes de Carnes. [en Línea]. <http://www.deperu.com/carnes/carne-pollo.php>. /.[citado en 2 de Diciembre de 2016].

DEREWIAKA, D.; MOLI SKA, E. Cholesterol transformations during heat treatment. En: Food chemistry, 2015, vol. 171, p. 233-240.

EL SITIO AVICOLA. Tendencias Avícolas Mundiales 2016: Crece el consumo de pollo en América. [En línea].

- <http://www.elsitioavicola.com/articles/2871/tendencias-avacolas-mundiales-2016-crece-el-consumo-de-pollo-en-amarica/>. [citado en 5 de Diciembre de 2016]
- EMANUEL, H. A., et al. Plasma cholesterol oxidation products (oxysterols) in human subjects fed a meal rich in oxysterols. En: Journal of food science, 1991, vol. 56, no 3, p. 843-847.
- EURACHEM WORKING GROUP, et al. The fitness for purpose of analytical methods: A laboratory guide to method validation and related topics. [en línea]. <http://www.eurachem.org/guides/pdf/valid.pdf>, 1998. [citado en 25 de Enero de 2017].
- GALVIN, K.; MORRISSEY, P. A.; BUCKLEY, D. J. Cholesterol oxides in processed chicken muscle as influenced by dietary α -tocopherol supplementation. En Meat science, 1998, vol. 48, no 1-2, p. 1-9.
- GAMBLE, M. H.; RICE, P. Effect of pre-fry drying of oil uptake and distribution in potato crisp manufacture. En: International journal of food science & technology, 1987, vol. 22, n° 5, p. 535-548.
- GARCÍA-CRUSSET, S.; et al. Oxysterols profiles of normal human arteries, fatty streaks and advanced lesions. En Free Radical Res. (2001) 53(1): 31-41.
- GIBBONS, Geoffrey F. The role of cytochrome P450 in the regulation of cholesterol biosynthesis. En: Lipids, 2002, vol. 37, no 12, p. 1163-1170.
- GIL, M. D., et al. Oxidación del colesterol en carne y derivados: Factores que determinan su formación. En: Anales de Veterinaria de Murcia. 2004. p. 21-34.
- Gottau G. Los alimentos Agrupados según su nivel de Colesterol. [en línea]. <https://www.vitonica.com/alimentos/los-alimentos-agrupados-segun-su-nivel-de-colesterol>. [Citado en 1 de Diciembre de 2016]
- GUARDIOLA, F., et al. Cholesterol and Phytosterol Oxidation Products: Analysis, Occurrence, and Biological Effects. Illinois: AOCS Press Champaign, 2002. p. 1-387. ISBN: 1-893997-34-0
- GUARDIOLA, F., et al. Biological effects of oxysterols: current status. Food and Chemical Toxicology, 1996, vol. 34, no 2, p. 193-211
- Guerrero H., et al. Perfil epidemiológico de enfermedades crónicas para la toma de decisiones en Pasto. En: Observatorio de Enfermedades Crónicas de Pasto. No.4.2015.
- HUR, Sun-Jin; PARK, G. B.; JOO, S. T. Formation of cholesterol oxidation products (COPs) in animal products. Food Control, 2007, vol. 18, no 8, p. 939-947.

HWANG, K. T.; MAERKER, G. Quantitation of cholesterol oxidation products in unirradiated and irradiated meats. En Journal of the American Oil Chemists' Society, 1993, vol. 70, no 4, p. 371-375.

INSTITUTO COLOMBIANO DE BIENESTAR FAMILIAR. Tabla de composición de alimentos colombianos. 2^a Edición. Bogotá: ICBF. (2015). p. 321. ISBN: 978-958-623-186-2.

KIM, S. K.; NAWAR, W. W. Parameters influencing cholesterol oxidation. En Lipids, 1993, vol. 28, no 10, p. 917-922.

KRESGE, Nicole; SIMONI, Robert D.; HILL, Robert L. The biosynthetic pathway for cholesterol: Konrad Bloch. En Journal of Biological Chemistry, 2005, vol. 280, no 10, p. 138-280.

KRITCHEVSKY, D. Cholesterol vehicle in experimental atherosclerosis. A brief review with special reference to peanut oil. En Archives of pathology & laboratory medicine, 1988, vol. 112, no 10, p. 1041-1044.

KULIG, Martin J.; SMITH, Leland L. Sterol metabolism. XXV. Cholesterol oxidation by singlet molecular oxygen. En: The Journal of organic chemistry, 1973, vol. 38, no 20, p. 3639-3642.

LARKESON, B.; DUTTA, P. C.; HANSSON, I. Effects of frying and storage on cholesterol oxidation in minced meat products. En: Journal of the American Oil Chemists' Society, 2000, vol. 77, no 6, p. 675-680.

LEE, J. I., et al. Formation of cholesterol oxides in irradiated raw and cooked chicken meat during storage. En Poultry science, 2001, vol. 80, no 1, p. 105-108.

LEE, Jin Joo; MYUNG, Seung-Woon. Simultaneous Analysis of Cholesterol Oxidation Products (COPs) in Powdered Milk Using HPLC/UV-Vis. En Bulletin of the Korean Chemical Society, 2013, vol. 34, n° 9, p. 2787-2794.

LEHMANN J., et al. Activation of the Nuclear Receptor LXR by Oxysterols Defines a New Hormone Response Pathway. En: The Journal of Biological Chemistry (1997). Vol. 272, p. 3137-3140.

LOZADA CASTRO Juan. Determinación de Óxidos de Colesterol en Muestras de Alimentos Mediante Cromatografía de Gases. Madrid, 2013, p. 1-438. Tesis Doctoral. En Universidad Complutense de Madrid Facultad de Ciencias Químicas Departamento Ciencia de Química Analítica.

LOZADA-CASTRO, Juan José, et al. Determinación de la formación de óxidos de colesterol en el proceso de preparación de frito pastuso usando como técnica de análisis HPLC. En Universidad y Salud, 2015, vol. 17, no 2, p. 177-191.

MAERKER, G.; BUNICK, F. J. Cholesterol oxides II. Measurement of the 5, 6-epoxides during cholesterol oxidation in aqueous dispersions. En Journal of the American Oil Chemists' Society, 1986, vol. 63, no 6, p. 771-777.

MARIUTTI, Lilian RB; NOGUEIRA, Gislaire C.; BRAGAGNOLO, Neura. Optimization and validation of analytical conditions for cholesterol and cholesterol oxides extraction in chicken meat using response surface methodology. En Journal of agricultural and food chemistry, 2008, vol. 56, no 9, p. 2913-2918.

MARIUTTI, Lilian Regina Barros; BRAGAGNOLO, Neura. A oxidação lipídica em carne de frango e o impacto da adição de sálvia (*Salvia officinalis*, L.) e de alho (*Allium sativum*, L.) como antioxidantes naturais. En: Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso), 2009, vol. 68, no 1, p. 1-11.

MARTINELLO, M. A.; PRAMPARO, M. Poder antioxidante de extractos de romero concentrados por destilación molecular. En: Información tecnológica, 2005, vol. 16, no 5, p. 17-20.

MAYA, Y.; MOLINA, D.; VARGAS, J. Oxidación lipídica y antioxidantes naturales en derivados cárnicos. En: Journal of Engineering and Technology, 2016, vol. 2, no 2, p. 50-66.

MISSLER, S. R.; WASILCHUK, B. A.; MERRITT, C. Separation and identification of cholesterol oxidation products in dried egg preparations. En: Journal of Food Science, 1985, vol. 50, no 3, p. 595-598.

MONTES, Nicolás, et al. Absorción de aceite en alimentos fritos. En: Revista chilena de nutrición, 2016, vol. 43, no 1, p. 87-91.

MONTEZUMA A.; ALVAREZ W. Formación de óxidos de Colesterol en el proceso de Preparación del Frito Pastuso. Trabajo de Grado (Químico). En: Universidad de Nariño. Facultad de ciencias Exactas y Naturales. Departamento de Química. Colombia (2014). p. 39-40.

MOREL, Diane W.; LIN, Chen Yi. Cellular biochemistry of oxysterols derived from the diet or oxidation in vivo. En: The Journal of Nutritional Biochemistry, 1996, vol. 7, no 9, p. 495-506.

Nawar W. Lipids: En: Food Chemistry. Ed Fenema O.R. Marcel Dekker. New York. 1985.

NIELSEN, J. H.; OLSEN, C. E.; SKIBSTED, L. H. Cholesterol oxidation in a heterogeneous system initiated by water-soluble radicals. En: Food chemistry, 1996, vol. 56, no 1, p. 33-37.

ORATA, Francis. Derivatization reactions and reagents for gas chromatography analysis. En Advanced Gas Chromatography-Progress in Agricultural, Biomedical and Industrial Applications. InTech, 2012.

PANIANGVAIT, P., et al. Cholesterol oxides in foods of animal origin. En: Journal of Food Science, 1995, vol. 60, no 6, p. 1159-1174.

PENG, Shi-Kaung; TAYLOR, C. Bruce. Cholesterol autoxidation, health and arteriosclerosis. En: Nutritional Considerations in a Changing World. Karger Publishers, 1984. p. 117-154.

Pie J., Spahis k., Seillan C. Evaluation of oxidative degradation of cholesterol in food and food ingredients: identification and quantificación of cholesterol oxides. J agric. En: Food chem. 1990. 38. 973-979

POKORNY, Jan; RÉBLOVÁ, Zuzana. Effect of food components on changes in frying oil. En: Food technology and Biotechnology, 1999, vol. 37, p. 139-144.

RAO, V. Kesava, et al. Effect of cooking and storage on lipid oxidation and development of cholesterol oxidation products in water buffalo meat. En: Meat science, 1996, vol. 43, no 2, p. 179-185

RODRIGUEZ-ESTRADA, M. T.; CABONI, M. F. Determination of cholesterol oxidation products by high-performance liquid chromatography. En: GUARDIOLA Francesc, et al. Cholesterol and Phytosterol Oxidation Products: Analysis, Occurrence, and Biological Effects. Illinois: AOCS Press Champaign, 2002. p. 71-100.

ROGERS, Adrienne E. Diet and toxicity of chemicals. En: The Journal of Nutritional Biochemistry, 1991, vol. 2, no 11, p. 579-593.

ROJANO, Benjamín, et al. Oxidación de lípidos y antioxidantes. Medellín. UNAL.1997. 59 p.

SALDANHA, Tatiana, et al. HPLC separation and determination of 12 cholesterol oxidation products in fish: comparative study of RI, UV, and APCI-MS detectors. En: Journal of agricultural and food chemistry, 2006, vol. 54, no 12, p. 4107-4113.

SAMPAIO, G. R., et al. Effect of natural antioxidant combinations on lipid oxidation in cooked chicken meat during refrigerated storage. En: Food Chemistry, 2012, vol. 135, no 3, p. 1383-1390.

SAMPAIO, G. S. Ocorrência de óxido de colesterol e análise do perfil lipídico em camarão salgado-seco. Tesis de Doctorado. En: Universidad de São Paulo. Brasil (2004), p.4.

SANCHEZ-MUNIZ, F. J.; CUESTA, C. Tecnología de la Fritura: Alteraciones de las grasas utilizadas debido al proceso, tipo de grasa culinaria y alimento. En: Aliment., Equipos y Tecnol, 1991, vol. 3, p. 101-16.

SANDER, B. D., et al. Quantification of cholesterol oxidation products in a variety of foods. En: Journal of Food Protection, 1989, vol. 52, no 2, p. 109-114.

SHIMADA, H., et al. Rapid modulation of platelet aggregation in plasma by oxygenated sterols. En: Journal of applied biochemistry, 1984, vol. 6, no 3, p. 151-155.

SKOOG D., Holler F., Nieman T. Principios de análisis instrumental, quinta edición, Ed. McGraw-Hill (2007), p 810-811

SMITH, Leland L. Cholesterol autoxidation 1981–1986. En: Chemistry and Physics of Lipids, 1987, vol. 44, no 2-4, p. 87-125.

SMITH, Leland L.; TENG, Jon I. Sterol metabolism. XXIX. Mechanism of microsomal lipid peroxidation in rat liver. En: Journal of the American Chemical Society, 1974, vol. 96, no 8, p. 2640-2641.

SOTO, Ida, et al. Los óxidos de colesterol en los alimentos y su efecto en la salud. En: Ciencia (2004). P. 66-75.

SOUZA, Vera Lúcia Ferreira de; SILVA, Rui Sérgio S. Dietary vitamin E supplementation on cholesterol and cholesterol oxides of pig meat and cooked ham. En: Brazilian Archives of Biology and Technology, 2006, vol. 49, n° 2, p. 197-205.

STAPRANS, Ilona, et al. Oxidized cholesterol in the diet accelerates the development of aortic atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 1998, vol. 18, no 6, p. 977-983.

TAI, C.-Y.; CHEN, Y. C.; CHEN, B. H. Analysis, formation and inhibition of cholesterol oxidation products in foods: an overview (part II). En: Journal of Food and Drug Analysis, 2000, vol. 8, no 1.

TERRASA A. Alternativas tecnológicas aplicables al desarrollo y conservación de productos cárnicos cocidos (patés) durante el almacenamiento refrigerado. Tesis de maestría. En: Universidad de la Plata. Facultad de ciencias veterinarias. Argentina (2012). p. 13-16.

TIRADO, D. F.; ACEVEDO, D.; GUZMÁN, L. E. Freído por inmersión de los alimentos. En: ReCiTeIA, 2012, vol. 12, p. 72-80.

UBHAYASEKERA, Kumari. Cholesterol oxidation products—analytical methods and levels in sweets containing heated butter oil. Tesis Doctoral. Lantbruks En: university.Suecia (2004). p. 5-8.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO. Esteroides. [en línea]. <http://bq.unam.mx/~evazquez> [citado en 2 de diciembre de 2016].

USA Poultry & Egg Export Council. Contenido Nutritional de Carne de Pollo (sin piel) 1 por cada 100g de producto. [En línea]. http://usapeec.org.mx/nutricion/informacion_nutritional/pollo.html. /.[Citado en 2 de Diciembre de 2016].

VALENCIA, Idoia, et al. Enhancement of the nutritional status and quality of fresh pork sausages following the addition of linseed oil, fish oil and natural antioxidants. En: Meat Science, 2008, vol. 80, no 4, p. 1046-1054.

VALENZUELA, Alfonso, et al. Óxidos del colesterol (oxisteroles): factores que condicionan su formación, efectos biológicos, y su presencia en los alimentos. En: Revista chilena de nutrición, 2002, vol. 29, no 2, p. 116-124.

Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, Q2(R1), International Committee on Harmonization (2005). p. 8-13.

VELARDE E., González A. Colesterol y Óxidos de Colesterol en Carne de Pollo En: Revista de Química. Pontificia Universidad Católica Del Perú. (2006). p. 11-20.

VILLAMIZAR, M. P. Estandarización de métodos analíticos usados para el análisis de agua en el laboratorio del centro de estudios e investigaciones ambientales-CEIAM. Trabajo de Grado (Químico). En: Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Colombia (2008), p. 29.

ZANARDI, E., et al. Oxidative stability of lipids and cholesterol in salame Milano, coppa and Parma ham: dietary supplementation with vitamin E and oleic acid. En: Meat Science, 2000, vol. 55, no 2, p. 169-175.

ZHANG, W. B.; ADDIS, P. B.; KRICK, T. P. Quantification of 5 α -Cholestane-3 β , 5, 6 β -triol and Other Cholesterol Oxidation Products in Fast Food French Fried Potatoes. En: Journal of food science, 1991, vol. 56, no 3, p. 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. En: Atherosclerosis (2000) 149: 191-197.

ZUBILLAGA, M. P.; MAERKER, G. Quantification of three cholesterol oxidation products in raw meat and chicken. En: Journal of food science, 1991, vol. 56, n° 5, p. 1194-1196.

ZULUAGA F., INSUASTY B., YATES B. Analisis Organico Clasico y Espectral, Ed. Universidad del Valle (2000), p 195-200.

ANEXOS

Anexo A: Presentación al Congreso Argentino de Química Analítica

XXXI Congreso Argentino de Química
25 al 28 de Octubre de 2016 - Asociación Química Argentina
Sánchez de Bustamante 1749 - Ciudad de Buenos Aires - Argentina
The Journal of The Argentine Chemical Society Vol. 103 (1-2) January - December 2016 ISSN: 1852-1207
Aveles de la Asociación Química Argentina AAGAE 005 - 198

DETERMINACION POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC) DE OXIDOS DE COLESTEROL EN CARNE DE POLLO

D. Ortega-Ortega¹, D. Arturo², J.J. Lozada-Castro¹, J.P. Jimenez²

1. Grupo de Investigación Estudio de Sistemas Contaminantes- Departamento de Química. Universidad de Nariño. Pasto-Colombia.
2. Grupo de Investigación Estudio de Sistemas Contaminantes-Laboratorio de Cromatografía. Universidad de Nariño. Pasto-Colombia.

Email: dianandrea1812@hotmail.com

Universidad de Nariño. Calle 18 Cra 50, Ciudad Universitaria Torobajo. Pasto-Colombia.

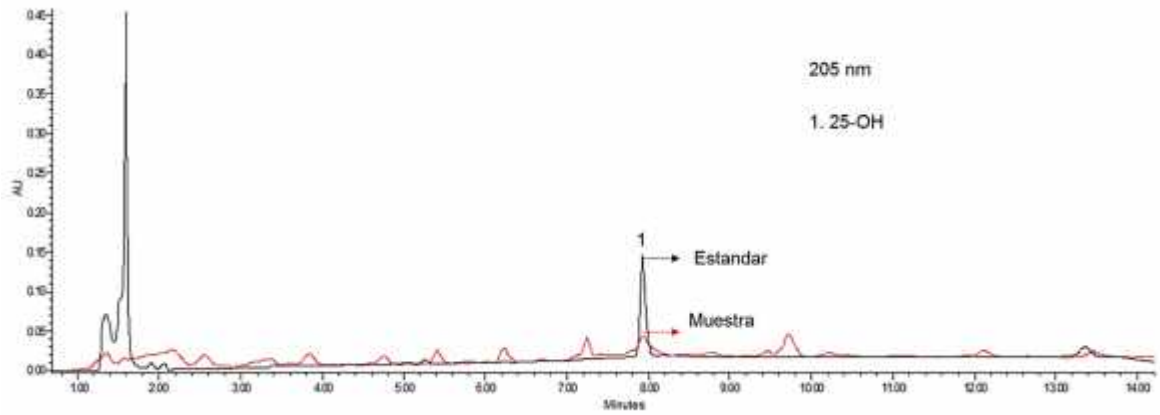
Introducción: Según cifras de la (OMS) las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en el mundo.¹ Este tipo de enfermedades están asociadas al consumo de alimentos ricos en grasas y colesterol. Diferentes factores como, la temperatura de cocción, almacenamiento y conservación inducen a la oxidación del colesterol dando origen a la formación de numerosos compuestos potencialmente tóxicos para la salud denominados óxidos de colesterol (COPs). Estudios han demostrado la incidencia de los COPs como causante de lesiones arterioscleróticas, además presentan actividad carcinógena, citotóxica y angiotoxica.^{2,3} **Objetivo:** el objetivo del presente trabajo fue la determinación de los COPs en muestras de carne de pollo sometida a procesos de fritura que se comercializa en la ciudad de Pasto-Colombia. **Metodología:** La extracción de los óxidos de colesterol en las piezas de carne (pechuga y contramuslo) se realizó mediante lixiviación con cloroformo, y posterior limpieza y concentración de las muestras por SPE utilizando cartuchos de sílica. ⁴el análisis se realizó mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC-PDA) empleando un detector de fotoarreglo de diodos y una columna analítica de fase reversa C8 (150mm x 4,6mm x 3,5µm). **Resultados:** Se identificaron principalmente los COPs: 25-Hidroxicolesterol, 7β-hidroxicolesterol y 7-Cetocolesterol. **Conclusión:** Los niveles más altos de COPs se encontraron en las muestras de contramuslo las cuales presentaban el mayor contenido de lípidos y colesterol. El óxido de colesterol 25-hidroxicolesterol presentó los más altos niveles de concentración en las muestras analizadas.

Referencias:

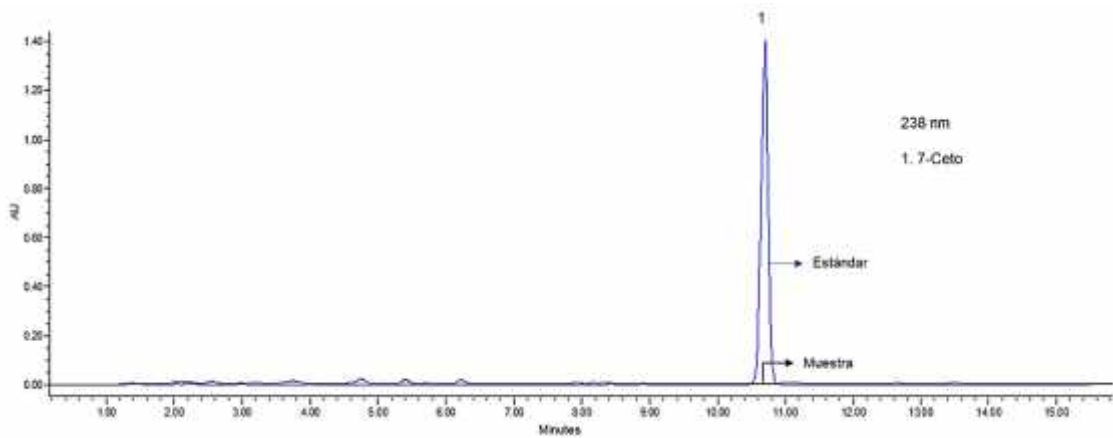
1. Organización Mundial de la Salud (2016).
2. Brown, M. S., Goldstein, J. L. Suppression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase activity and the inhibition of growth of human fibroblasts by 7-ketocholesterol. *J Biol Chem.* 1974; 249: 7306-7314.
3. Lehmann, J. M., Klewer, S. A., Moore, L. B. Activation of nuclear receptor LXR by Oxysterols defines a new hormone response pathway. *J Biol Chem.* 1997; 272: 31-37-3140.

Anexo B: Cromatogramas comparativos HPLC-PDA de los estándares de óxidos de colesterol en materias primas.

A: Pechuga

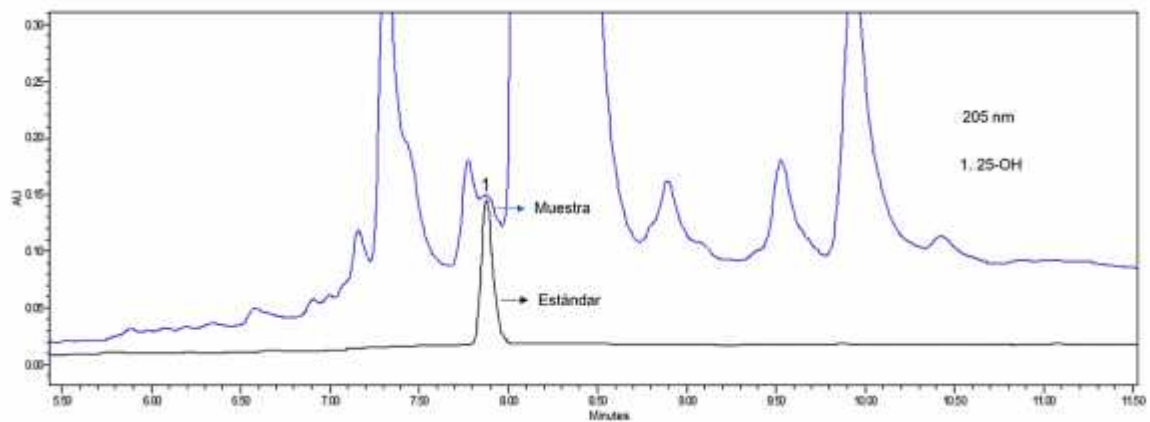


Fuente: Esta Investigación

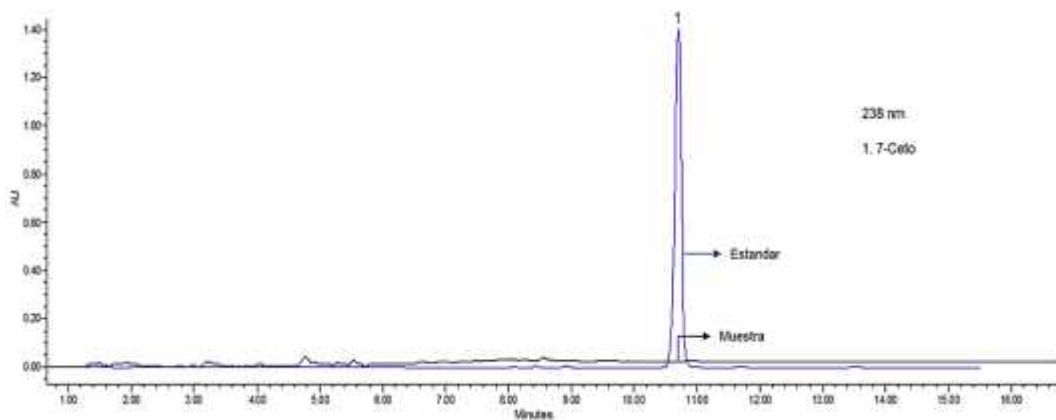


Fuente: Esta Investigación

B: Contramuslo

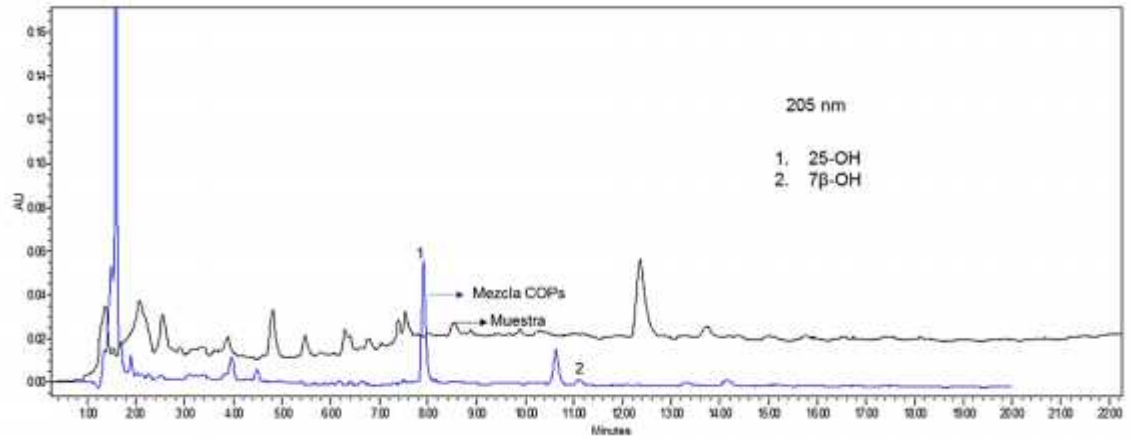


Fuente: Esta Investigación

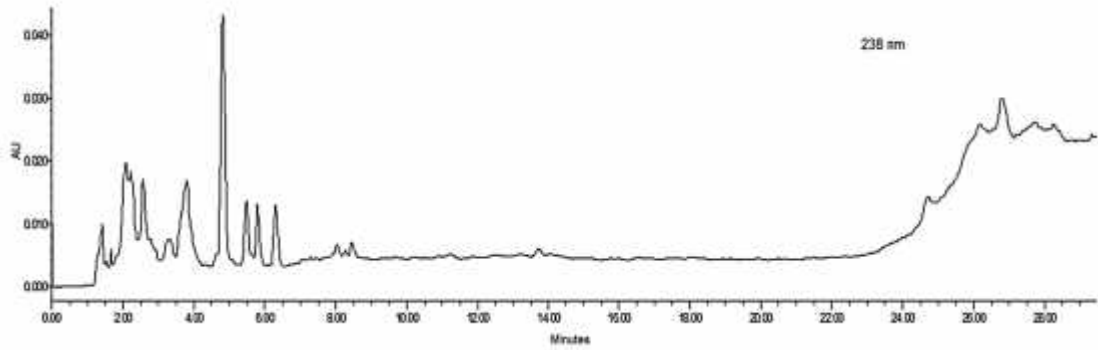


Fuente: Esta Investigación

C: Aceite nuevo con mezcla de COPs

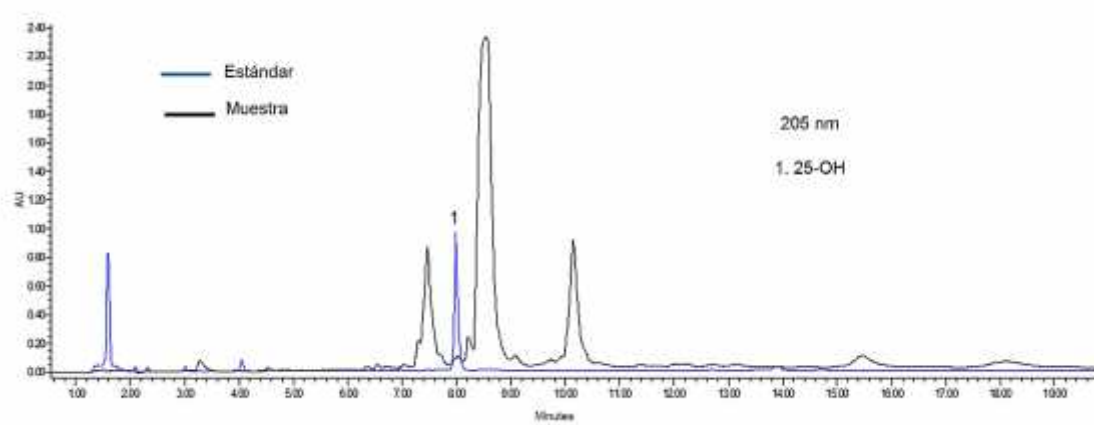


Fuente: Esta Investigación

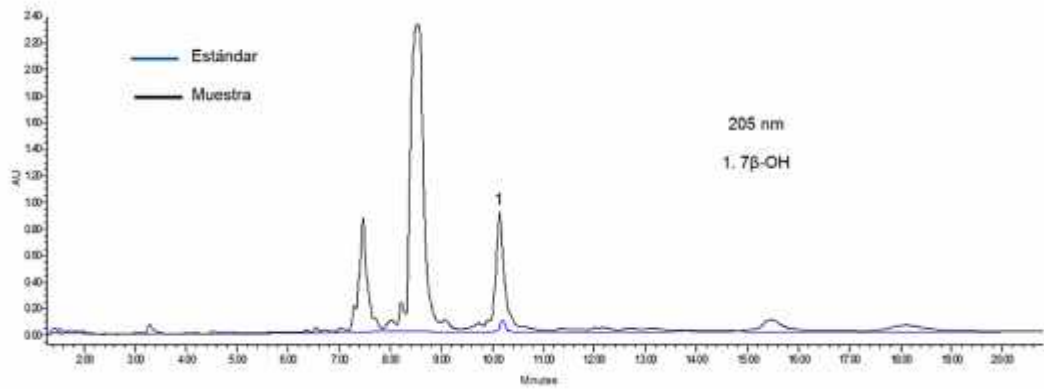


Fuente: Esta Investigación

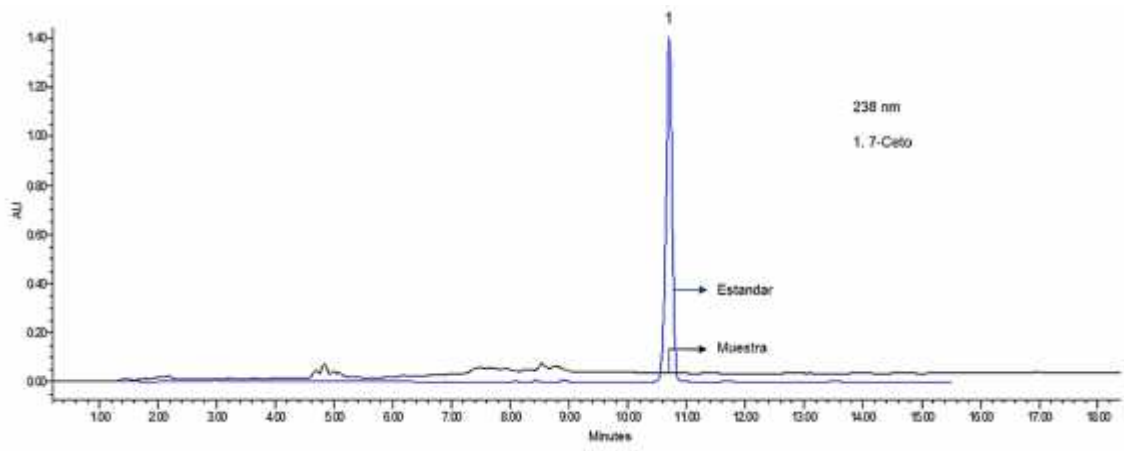
D: Aceite reutilizado



Fuente: Esta Investigación



Fuente: Esta Investigación



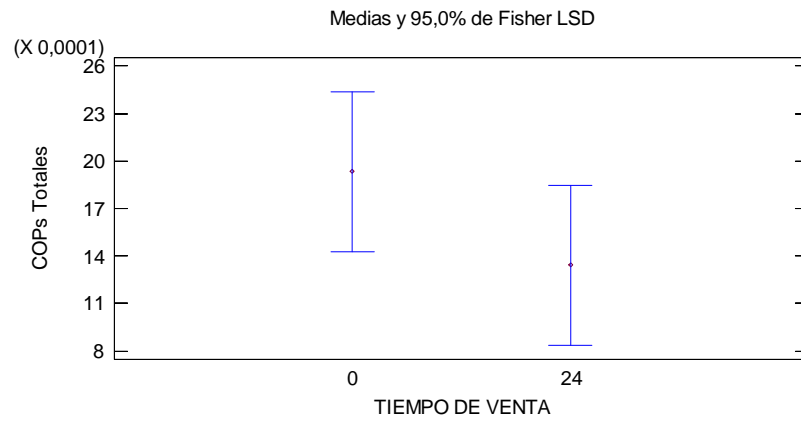
Fuente: Esta Investigación

Anexo C: tabla ANOVA

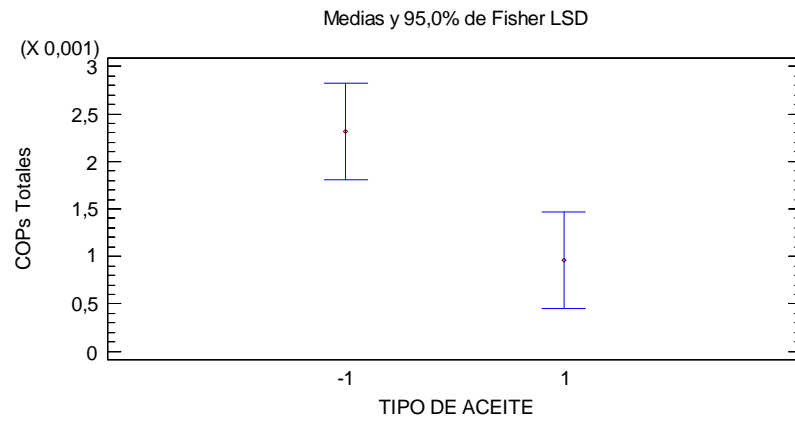
<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:TIPO DE ACEITE	0,0000146765	1	0,0000146765	7,00	0,0177
B:TIEMPO DE VENTA	0,00000278329	1	0,00000278329	1,33	0,2663
C:TIPO DE PIEZA	1,52388E-7	1	1,52388E-7	0,07	0,7910
D:TIEMPO DE FRITURA	0,00000274209	1	0,00000274209	1,31	0,2698
AB	0,0000036502	1	0,0000036502	1,74	0,2057
AC	0,00000214333	1	0,00000214333	1,02	0,3272
AD	0,00000997712	1	0,00000997712	4,76	0,0445
BC	0,00000111655	1	0,00000111655	0,53	0,4762
BD	5,49056E-7	1	5,49056E-7	0,26	0,6159
CD	2,50179E-7	1	2,50179E-7	0,12	0,7344
ABC	8,70147E-7	1	8,70147E-7	0,41	0,5287
ABD	2,94339E-7	1	2,94339E-7	0,14	0,7129
ACD	1,55875E-8	1	1,55875E-8	0,01	0,9324
BCD	1,0438E-8	1	1,0438E-8	0,00	0,9446
bloques	4,92337E-8	1	4,92337E-8	0,02	0,8802
Error total	0,0000335692	16	0,0000209808		
Total (corr.)	0,0000728497	31			

Fuente: Esta Investigación

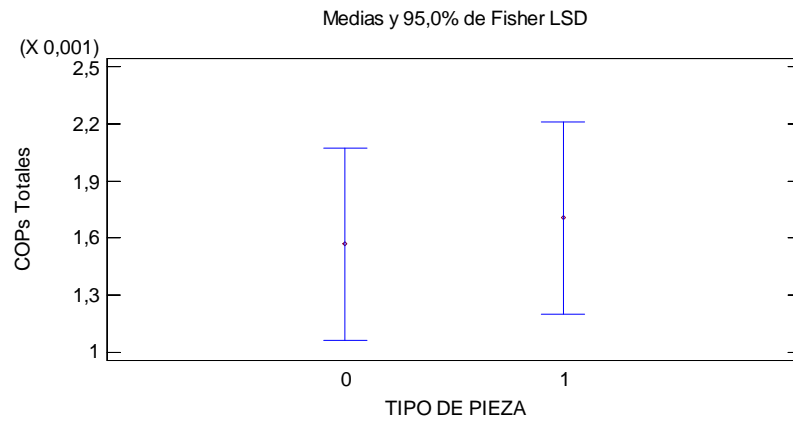
Anexo D: Diagramas de Fisher al 95% de los factores



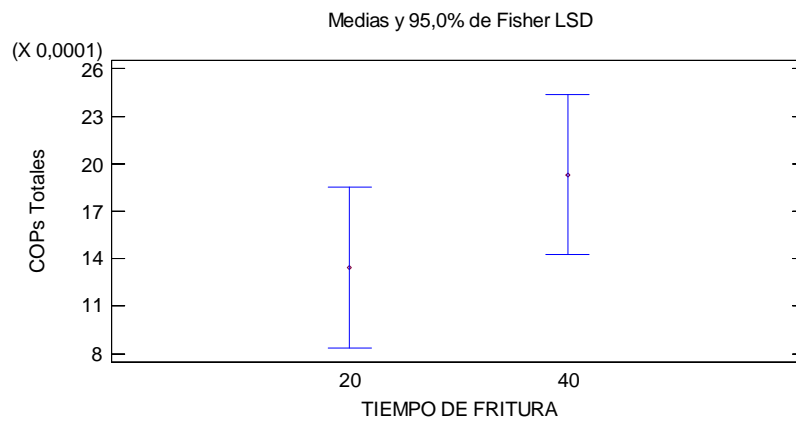
Fuente: Esta Investigación



Fuente: Esta Investigación

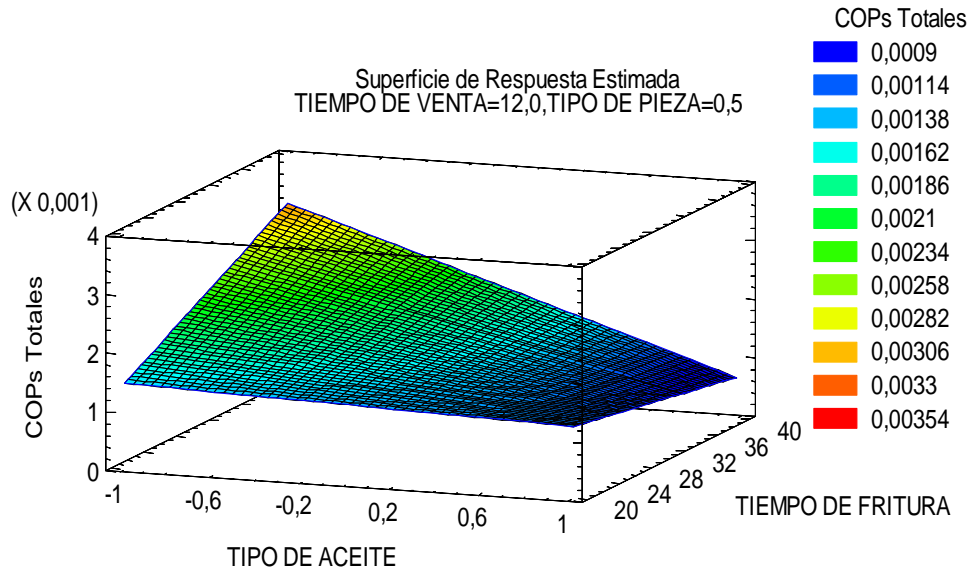


Fuente: Esta Investigación



Fuente: Esta Investigación

Anexo E: Grafica de superficie de respuesta y ecuación del diseño.



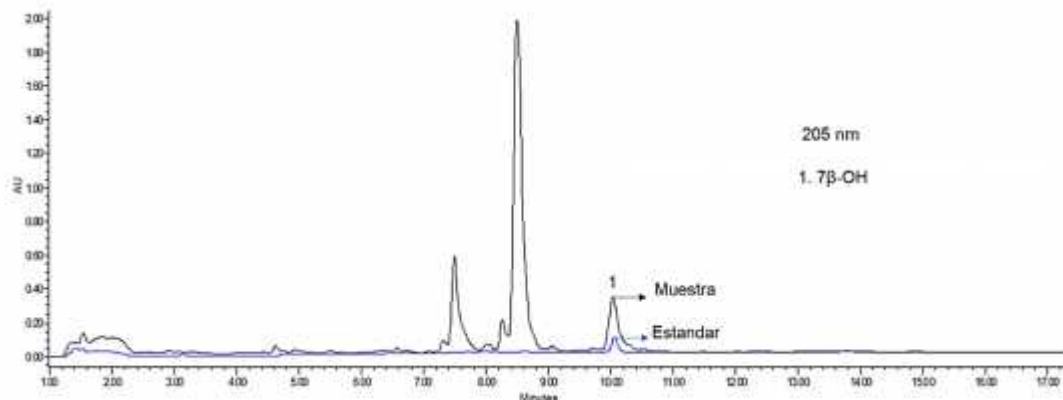
Fuente: Esta Investigación

Ecuación del modelo ajustado

$$\begin{aligned} \text{COPs Totales} = & 0,000567845 + 0,00092019 \cdot T_a - 0,0000119109 \cdot T_v + 0,000186583 \cdot T_p + \\ & 0,0000494077 \cdot T_f - 0,00000957327 \cdot T_a \cdot T_v + 0,0000553825 \cdot T_a \cdot T_p - 0,0000676354 \cdot T_a \cdot T_f \\ & + 0,0000401628 \cdot T_v \cdot T_p - 9,41066 \cdot 10^{-7} \cdot T_v \cdot T_f - 0,0000140719 \cdot T_p \cdot T_f + \\ & 0,0000274834 \cdot T_a \cdot T_v \cdot T_p + 7,99222 \cdot 10^{-7} \cdot T_a \cdot T_v \cdot T_f + 0,00000441411 \cdot T_a \cdot T_p \cdot T_f - 3,0101 \cdot 10^{-7} \cdot T_v \cdot T_p \cdot T_f. \end{aligned}$$

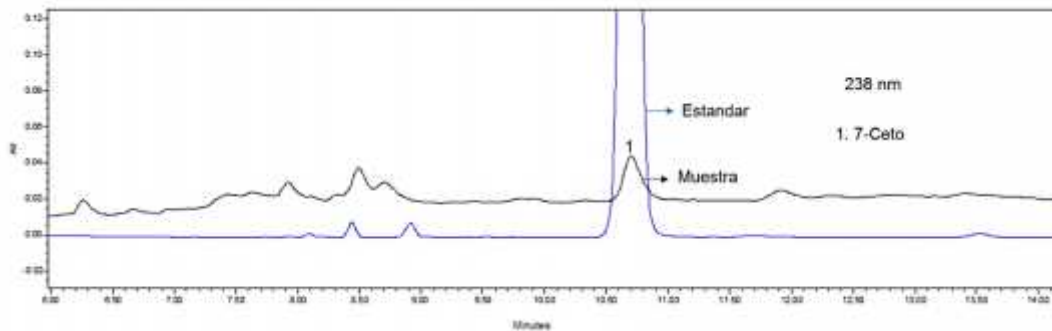
Anexo F: Cromatogramas comparativos HPLC-PDA de las muestras del diseño experimental con estándares de COPs.

A: Exp. 27



Fuente: Esta Investigación

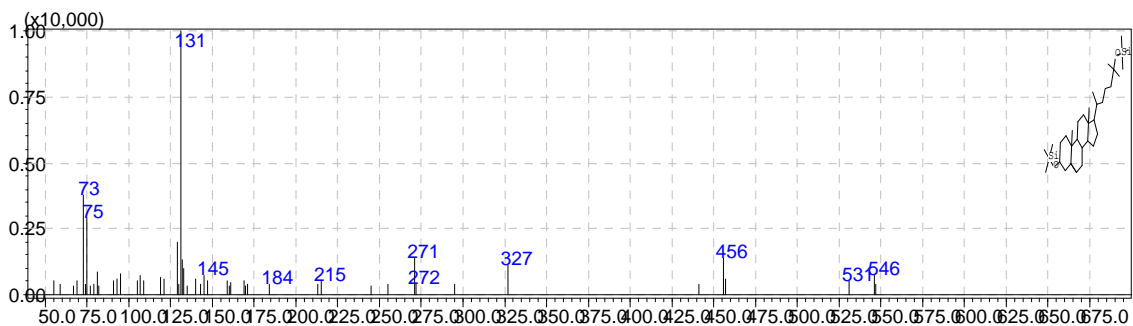
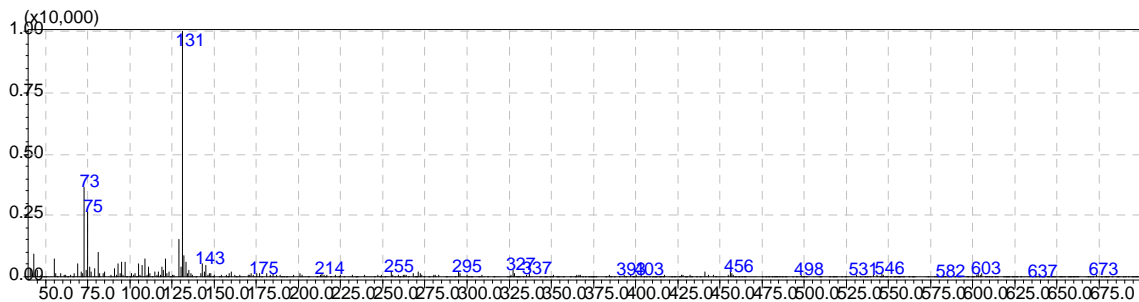
B: Exp 1



Fuente: Esta Investigación

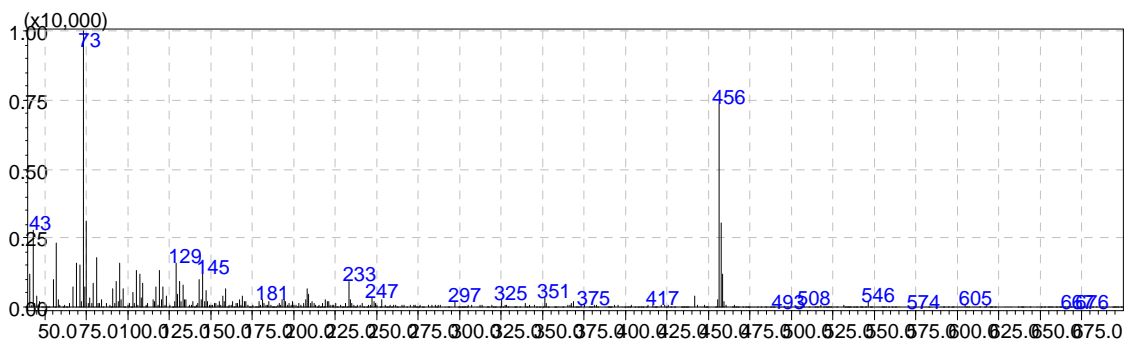
Anexo G: Espectros de masas por GC-MS de estándares de COPs

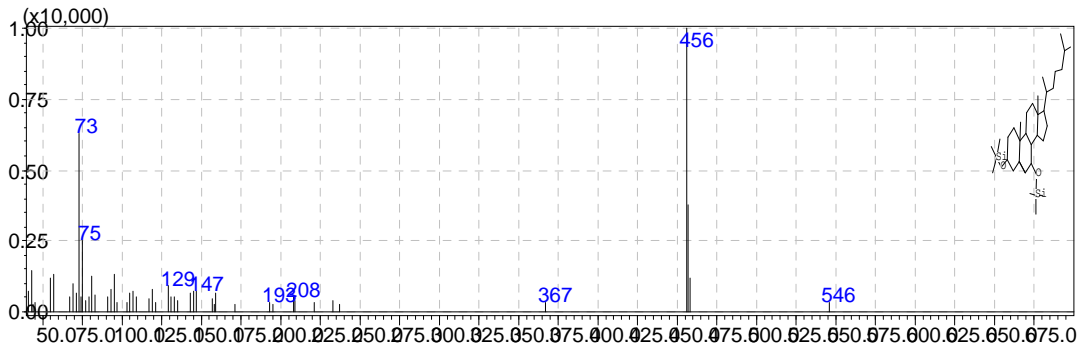
A. 25-OH



Fuente: Esta Investigación

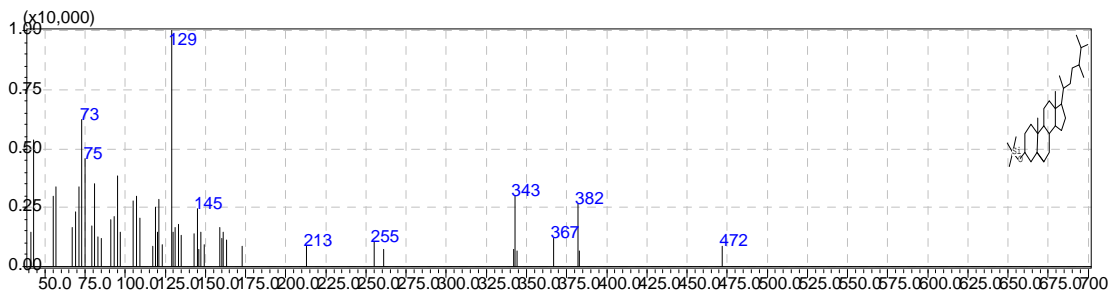
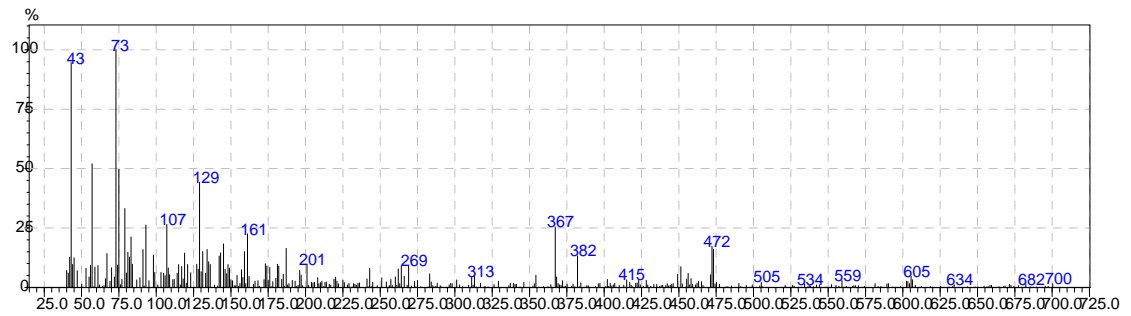
B. 7 β -OH





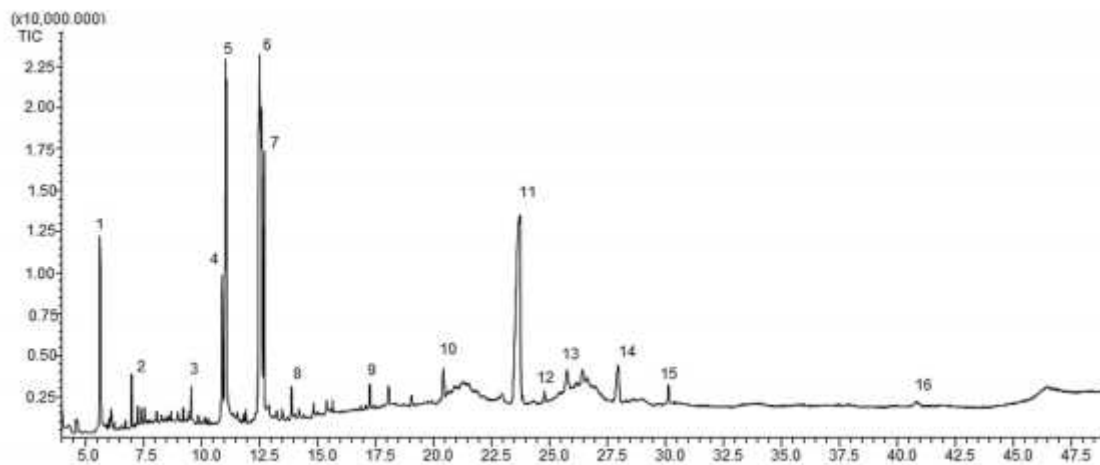
Fuente: Esta Investigación

C. 7-Ceto



Fuente: Esta Investigación

Anexo H: Cromatograma de masas por GC-MS de una muestra tomada en la zona Norte.



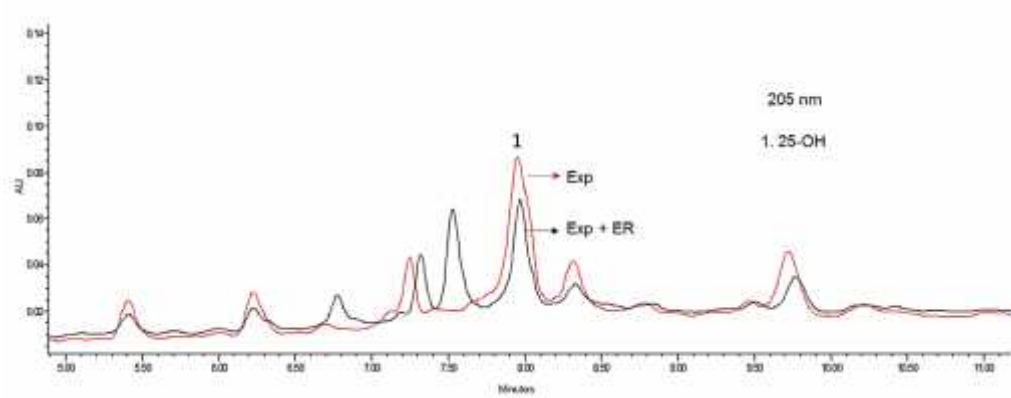
Fuente: Esta Investigación

Pico N°	Identificación tentativa
1	Ácido fosfórico
2	Ácido Hexedienoico
3	Ácido Mirístico
4	Ácido Palmitoleico
5	Ácido Palmítico
6	Ácido Linoleico
7	Ácido Estearico
8	Ácido Araquidónico
9	Monoleína
10	Escualeno
11	Colesterol
12	7 -Hidroxicolesterol
13	- tocoferol
14	Colestanol
15	25-Hidroxicolesterol
16	2-((1Z)-1-Octadecenilo)etil estearato

Fuente: Esta Investigación

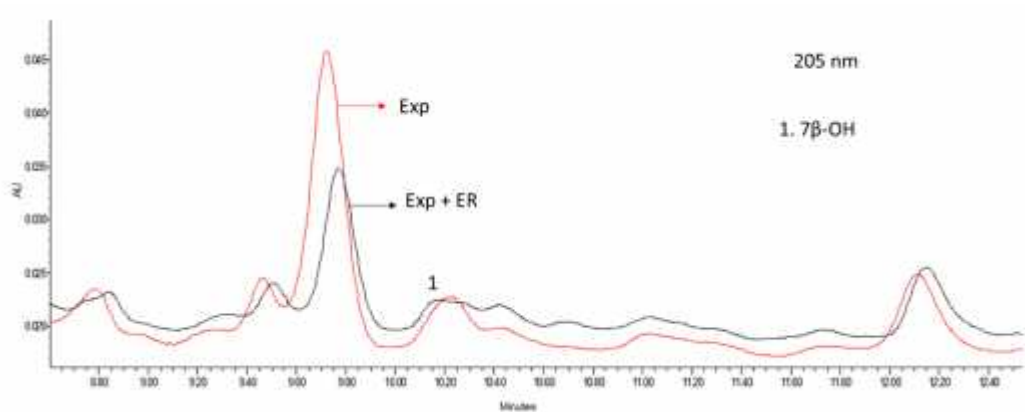
Anexo I: Cromatogramas comparativos de HPLC-PDA de experimentos con extracto de Romero.

A. Pollo crudo:



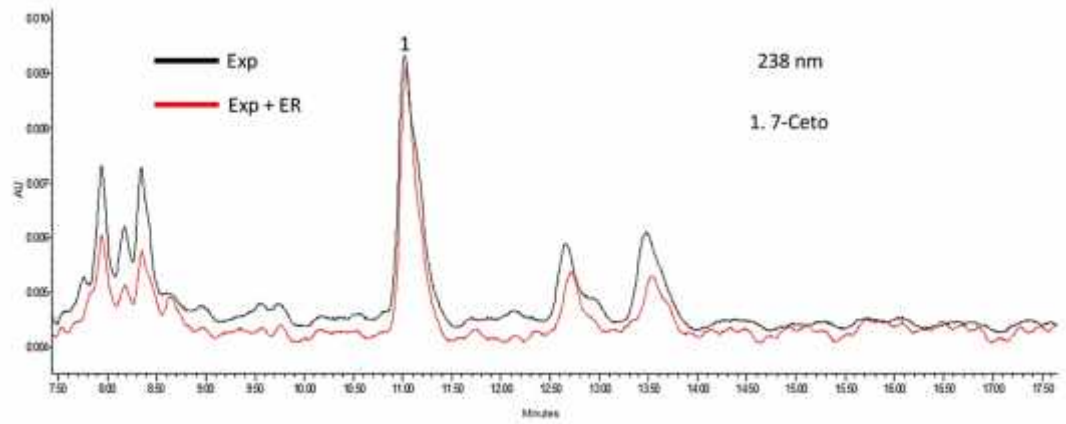
Fuente: Esta Investigación

B: Pollo crudo:



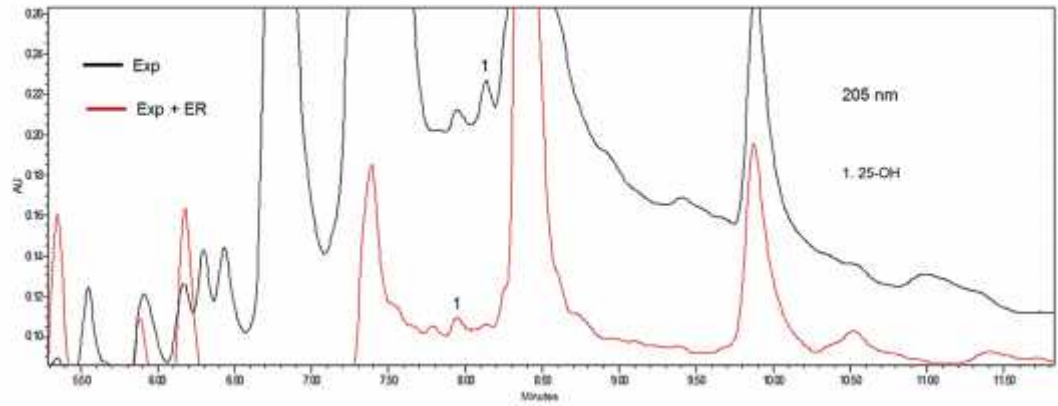
Fuente: Esta Investigación

C: Pollo crudo:



Fuente: Esta Investigación

D: Aceite Reutilizado



Fuente: Esta Investigación