

Determinación de hidroperóxidos totales en aceite de girasol ozonizado mediante el método de oxidación ferrosa en xilenol naranja

Por **Goitybell Martínez Téllez***, **Rebeca Hernández Tápanez** y **Maritza Díaz Gómez**

Centro de Investigaciones del Ozono. Ave. 15 y calle 230, Siboney, Playa,
Ciudad de la Habana, Cuba. Apartado 6412. Teléfono (537) 271-1157.
Fax (537) 271-0233. E-mail: ozono@infomed.sld.cu

RESUMEN

Determinación de hidroperóxidos totales en aceite de girasol ozonizado mediante el método de oxidación ferrosa en xilenol naranja.

Se analizaron muestras de aceite de girasol ozonizado a diferentes dosis de ozono aplicada y a cada una le fue determinada la concentración de hidroperóxidos totales (HPT) empleando el método de oxidación ferrosa en xilenol naranja (OFX) y el índice de peróxido (IP) empleando el método yodométrico. Para el montaje de la técnica de OFX se evaluó el efecto de cantidades crecientes de aceite de girasol ozonizado, donde se obtuvo una relación lineal entre un contenido de aceite de 2 a 17 μg por ensayo y la absorbancia medida a 560 nm. Se realizó la calibración del reactivo de OFX y el cálculo del coeficiente de extinción para la determinación de HPT de las muestras ozonizadas. La correlación establecida entre la determinación de HPT por la técnica de OFX y el IP mostró una relación lineal ($r = 99,29\%$; $r^2 = 98,59\%$). Estos resultados demuestran que este método es apropiado para la determinación de HPT en aceite de girasol ozonizado.

PALABRAS-CLAVE: Aceite de girasol ozonizado - HPT - OFX - Xilenol naranja.

SUMMARY

Measurement of the total hydroperoxides in ozonated sunflower oil using the ferrous oxidation in xylenol orange assay.

Total hydroperoxides (HPT) concentration using the ferrous oxidation in xylenol orange (OFX) assay and peroxide value (IP) using iodometric assay, were determined in sunflower oil samples ozonated at different ozone dosages. The effect of an increasing amount of ozonated sunflower oil was evaluated by assembly assay, where a lineal relationship was obtained between oil amounts from 2 to 17 μg in the assay and absorbance units measured at 560 nm. The OFX reagent calibration and the extinction coefficient calculation were carried out for HPT measurement in ozonated samples. The correlation established between IP and the concentration obtained by OFX assay showed a lineal relationship ($r = 99.29\%$; $r^2 = 98.59\%$). These results confirm that this assay is appropriate for HPT measurement in ozonated sunflower oil.

KEY-WORDS: HPT - OFX - Ozonated sunflower oil - Xylenol orange.

1. INTRODUCCIÓN

La interacción del ozono con los aceites de origen vegetal genera la formación de una mezcla de compuestos químicos (ozónidos, hidroperóxidos, aldehí-

dos entre otros), los cuales son responsables del efecto germicida (Lezcano, 1996).

Para la determinación del contenido de peróxidos en los aceites vegetales ozonizados se emplea comúnmente el método yodométrico, como una medida de la concentración de los productos activos, el cual está basado en la capacidad de los peróxidos de oxidar el ión yoduro a yodo (Hicks, 1979); (B.P., 2000). Este ensayo presenta varias desventajas, una de ellas es la interferencia del oxígeno molecular en la liberación de yodo, lo cual afecta el valor real del índice (Nourooz-Zadeh, 1995). Otra desventaja es que el yoduro de potasio reacciona con los peróxidos u otros productos similares de oxidación de los aceites, por lo que el índice obtenido es una aproximación de estos peróxidos (IUPAC, 1964) y la otra desventaja que afecta cuantitativamente el valor de este índice, es que en dos minutos de reacción para oxidar el ión yoduro, no reaccionan todos los peróxidos presentes en la muestra ozonizada, como por ejemplo los peróxidos poliméricos y los peróxidos de mayor peso molecular que los triglicéridos que se encontraban originalmente en el aceite de girasol (Ledeá, 2003).

El método de oxidación ferrosa en xilenol naranja (OFX) ha sido utilizado para medir pequeñas cantidades de peróxido de hidrógeno en solución tampón acuoso (Wolf, 1994), para medir hidroperóxidos acumulados en las lipoproteínas de baja densidad del plasma sanguíneo (Jiang, 1992) y para evaluar el contenido de hidroperóxidos de los aceites comestibles (Nourooz-Zadeh, 1995).

La información sobre las determinaciones de peróxidos e hidroperóxidos totales en aceites vegetales ozonizados es limitada. En respuesta a la obtención de un método simple y sensible para medir hidroperóxidos totales (HPT) en este sustrato, han sido objetivos de este estudio el desarrollo de la técnica de OFX en el aceite de girasol ozonizado, la cual ha tenido como ventaja que se utilizan pequeñas cantidades de muestra y se mide la concentración de hidroperóxidos selectivamente y el establecimiento de una relación entre la determinación de HPT por el método de OFX y la determinación de peróxidos (IP) por el método yodométrico.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Muestras

El aceite de girasol calidad comestible fue obtenido de la firma Molinos (Argentina).

2.2. Equipos

Ozonizador TRAILIGAZ Labo, Espectrofotómetro Pharmacia LKB ULTROSPEC III, Centrífuga refrigerada JOUAN.

2.3. Reactivos

Sulfato ferroso de amonio hexahidratado, 1-propanol y ácido sulfúrico de ANALAR-BDH, Inglaterra. Hidroxitolueno butilado (BHT), xilenol naranja, metanol grado HPLC y terc-butilhidroperóxido de SIGMA, Estados Unidos. Yoduro de potasio, tiosulfato de sodio, ácido acético, cloroformo, almidón, hidróxido de potasio, fenoftaleína, etanol y éter dietílico de MERCK, Alemania.

2.4. Procedimiento de ozonización

150 mL de aceite de girasol calidad comestible fueron introducidos en un reactor de burbujeo. Se realizó la ozonización a un voltaje de 170 V, una concentración inicial de ozono de 79,5 mg/L y un flujo constante de 42 L/h durante 2,5 h. Durante la reacción de ozonización, fueron tomadas 5 muestras de 5 mL a diferentes dosis de ozono aplicada (94, 239, 464, 529 y 601 mg de ozono/g de muestra) a las cuales se les determinó el IP.

2.5. Determinación del IP

Se pesaron 0,5 g de muestra y fueron mezclados con 30 mL de una mezcla de 3 volúmenes de ácido acético con 2 volúmenes de cloroformo. Posteriormente se adicionaron 0,5 mL de una solución saturada de yoduro de potasio en agua. La mezcla fue incubada durante 2 minutos, mezclada con 30 mL de agua y valorada con tiosulfato de sodio 0,1 M, agitando continuamente hasta la casi desaparición del color amarillo. Finalmente se adicionaron 5 mL de solución indicadora de almidón y se continuó valorando hasta la desaparición del color azul. El IP fue calculado de la expresión $100 v / m$, donde v es el volumen en mL y m es la masa en g de la muestra pesada. El IP se expresa en mmol-equivalente de oxígeno activo por Kg de muestra.

2.6. Preparación del reactivo de OFX:

El reactivo fue preparado disolviendo el xilenol naranja y el sulfato ferroso de amonio en 250 mM de

ácido sulfúrico hasta una concentración final de 1 mM para el xilenol naranja y 2,5 mM para el sulfato ferroso de amonio. Se adicionó un volumen de este reactivo concentrado, a 9 volúmenes de metanol que contenía 4,4 mM de BHT. Se obtuvo un reactivo de trabajo con 250 μ M de sulfato ferroso de amonio, 100 μ M de xilenol naranja, 2,5 mM de ácido sulfúrico y 4 mM de BHT en 90 % v/v con metanol.

2.7. Evaluación del efecto del contenido de aceite de girasol ozonizado en el montaje de la técnica OFX

Se pesó una gota (15 a 20 mg) de cada una de las muestras con diferentes dosis de ozono aplicada (94, 239, 464, 529 y 601 mg de ozono/g de muestra) y se disolvió en 10 mL de 1-propanol. De esta disolución se tomó 1 mL y se disolvió nuevamente en 10 mL de 1-propanol. De esta última disolución se tomaron siete alícuotas diferentes (25,6; 37,5; 50,6; 63,4; 76,2; 88,6 y 101,2 μ L) y fueron mezcladas con el reactivo de OFX hasta completar 1 mL en tubos de microcentrífugas. Todas las mezclas anteriores fueron incubadas durante 30 minutos y centrifugadas a 3 800 rpm durante 30 minutos. La absorbancia del sobrenadante fue leída a 560 nm en el espectrofotómetro. La masa en μ g empleada en cada ensayo se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\mu\text{g/ensayo} = m / (100 V) \quad (1)$$

donde: m es la masa de la gota en μ g, V es la alícuota tomada de la última disolución y $1/100$ es el factor de dilución.

Este procedimiento se realizó por triplicado en las cinco muestras de aceite de girasol ozonizado a diferentes dosis de ozono aplicada, con el objetivo de conocer el efecto de la cantidad creciente de aceite empleada en el estudio y escoger la alícuota correspondiente a la mejor disolución.

2.8. Determinación del coeficiente de extinción mediante la calibración del reactivo de OFX con terc-butilhidroperóxido

Se disolvió el terc-butilhidroperóxido en aceite de girasol a las siguientes concentraciones: 97, 466, 805, 1113, 1393 y 1610 mmol/kg de aceite. Se pesó una gota de esta mezcla y se disolvió en 10 mL de 1-propanol. Se tomó 1 mL de esta disolución y se mezcló nuevamente con 10 mL de 1-propanol. De esta última disolución se tomaron 50,6 μ L, que fueron mezclados con el reactivo de OFX hasta completar 1 mL en tubos de microcentrífugas. Todas las mezclas anteriores fueron incubadas durante 30 minutos y centrifugadas a 3 800 rpm durante 30 minutos. La absorbancia del sobrenadante fue leída a 560 nm en el espectrofotómetro. El procedimiento se realizó por triplicado para

cada concentración. Se determinó el coeficiente de extinción (ϵ) del reactivo de OFX.

2.9. Determinación de la concentración de hidroperóxidos a las muestras de aceite de girasol ozonizado, mediante la técnica OFX

Se pesó una gota (15 a 20 mg) de cada una de las muestras con diferentes dosis de ozono aplicada y se disolvió en 10 mL de 1-propanol. De esta disolución se tomó 1 mL y se disolvió nuevamente en 10 mL de 1-propanol. De esta última disolución se tomaron 50,6 μ L que fue mezclado con el reactivo de OFX hasta completar 1 mL en tubos de microcentrífugas. Todas las mezclas anteriores fueron incubadas durante 30 minutos y centrifugadas a 3 800 rpm durante 30 minutos. La absorbancia del sobrenadante fue leída a 560 nm en el espectrofotómetro. Las concentraciones de las muestras fueron determinadas mediante la Ley de Lambert-Beer (Thielmann, 1973). Este ensayo se realizó por triplicado para cada una de las muestras de aceite de girasol ozonizado.

2.10. Análisis estadístico

Se determinaron los coeficientes de variación del método yodométrico de determinación de peróxidos (IP), el cual debe ser menor de 3,3 % para tres réplicas con un intervalo de aceptación de 95 a 105 % (Castro, 1989).

Se evaluó la repetibilidad del método de OFX mediante la comparación de los coeficientes de variación en las concentraciones inferior, media y

superior, con el coeficiente máximo (CV =16) aceptado según Horwitz, para un porcentaje de analito en la muestra de 0,0001 (Kolthoff, 1975). Para la evaluación de la linealidad se realizó la determinación de los coeficientes de correlación y determinación los cuales deben ser superiores a 99 % y 98% respectivamente e indican correspondencia entre los valores predichos por las rectas de ajuste y los obtenidos en los ensayos y la prueba de proporcionalidad donde el intervalo de confianza del intercepto (intercepto \pm error estándar \times t tabulada) debe incluir al 0 para que el intercepto no sea significativamente diferente de 0 (Castillo, 1996). Todo el análisis estadístico se realizó con ayuda del paquete de programas STATGRAPHICS versión 5,0.

3. RESULTADOS

3.1. Ozonización del aceite de girasol y determinación del IP

Las 5 muestras de aceite de girasol ozonizado a diferentes dosis de ozono aplicada, muestran IP crecientes en un rango de 183 a 829 mmol-equivalente/kg, según el avance de la reacción (Tabla 1).

3.2. Evaluación del efecto del contenido de aceite de girasol ozonizado en el montaje de la técnica OFX

El efecto del incremento de la cantidad de aceite de girasol ozonizado utilizada para la determinación de hidroperóxidos se muestra en la figura 1, donde se observa la absorbancia medida a 560 nm contra

Tabla 1

Muestras tomadas a lo largo del proceso de ozonización. Se muestran los mg de ozono para cada muestra, los valores obtenidos en la determinación del índice de peróxido (IP) y los valores de concentración de hidroperóxidos totales (HPT) calculados por la técnica OFX para tres determinaciones. DOA: Dosis de Ozono Aplicada. DE: Desviación estándar. CV: Coeficiente de variación

MUESTRA	TIEMPO (Horas)	DOA (mg /g)	IP (mmol-equiv/kg)			CONCENTRACIÓN HPT (mmol/kg)		
			MEDIA	DE	CV	MEDIA	DE	CV
1	0,4	94	184	6	3.07	235	9	3,78
2	1,0	239	360	12	3.24	540	46	8,57
3	1,9	464	615	4	0.6	778	19	2,46
4	2,2	529	695	11	1.63	906	42	4,64
5	2,5	601	829	27	3.28	1138	175	15,44

diferentes cantidades de aceite (2 a 17 $\mu\text{g}/\text{ensayo}$) calculadas mediante la ecuación (1), observándose linealidad entre estos parámetros. De las siete cantidades de aceite de girasol ozonizado, fue seleccionada la cantidad de 8 a 10 μg de aceite/ensayo, correspondiente con 50,6 μl como volumen de trabajo a utilizar para completar a 1 mL con el reactivo de OFX, para determinar el coeficiente de extinción molar y las concentraciones de HPT en cada una de las muestras a diferentes dosis de ozono aplicada. Este valor de 50,6 μl ha sido escogido ya que corresponde al punto medio del rango lineal establecido entre la cantidad inicial de aceite empleada en el ensayo y la absorbancia medida a 560 nm.

3.3. Calibración del reactivo de OFX

Las dos curvas de calibración obtenidas, por diferentes analistas en días diferentes, a partir del patrón terc-butilhidroperóxido ($y=0,072x+0,0331$; $y=0,0109x+0,0012$). mostraron una correlación lineal. Los coeficientes de correlación fueron 99,13 % y 99,99 % respectivamente, para un 95 % de significancia. Esto permitió determinar el coeficiente de extinción molar del reactivo de trabajo, cuyo valor es $6,4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3.4. Determinación de la concentración de hidroperóxidos a las muestras de aceite de girasol ozonizado, mediante la técnica OFX

En la Tabla 1 se muestran los resultados de la determinación de hidroperóxidos realizada a las cinco muestras de aceite de girasol ozonizado obtenidas a diferentes dosis de ozono aplicada, utilizando la técnica OFX.

3.5. Correlación entre la técnica de OFX y el IP

Se establece una correlación lineal entre el IP obtenido mediante el ensayo yodo métrico (IP) y las concentraciones de HPT utilizando la técnica de OFX, para las 5 muestras de aceite de girasol ozonizado a diferentes dosis de ozono aplicada. El coeficiente de correlación fue 99,30 %, para un 95 % de significancia.

4. DISCUSIÓN

Al ozonizar aceite de girasol a diferentes dosis de ozono aplicada podemos observar un aumento del índice de peróxidos, debido a que aumenta la formación de compuestos oxigenados (tabla 1), lo cual coincide con lo reportado por Díaz y colaboradores (Díaz, 1997) para la reacción del ozono con los ácidos grasos insaturados.

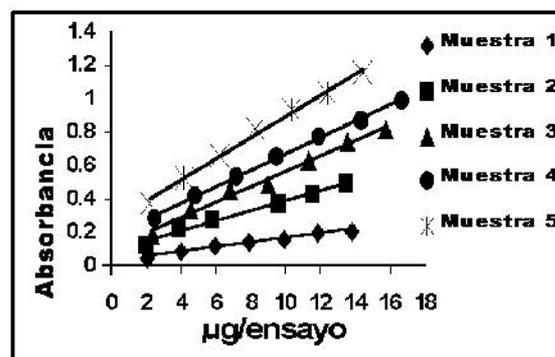


Figura 1

Efecto del incremento en la concentración de aceite de girasol ozonizado sobre la absorbancia medida a 560 nm durante el desarrollo de la técnica de FOX 2. Cada punto representa la media de tres determinaciones, realizadas en cada una de las cantidades de aceite tomadas en cada ensayo y para cada una de las cinco muestras de aceite de girasol a diferentes dosis de ozono aplicada. Los coeficientes de correlación (r) y determinación (r^2), fueron 99,02% y 98,06% para la muestra 1; 99,37% y 98,75% para la muestra 2; 99,35% y 98,71 % para la muestra 3; 99,94% y 99,88 % para la muestra 4 y 99,70% y 99,47 % para la muestra 5 respectivamente. Los coeficientes de variación fueron 5,0; 7,1 y 6,6 para la muestra 1; 2,4; 3,9 y 2,5 para la muestra 2; 6,6; 3,3 y 0,7 para la muestra 3; 0,2; 0,6 y 2,4 para la muestra 4 y 3,2; 1,0 y 1,3 para la muestra 5.

Se demuestra el efecto del incremento de la cantidad de aceite de girasol ozonizado, empleado en el ensayo de la determinación de la concentración de HPT en la Figura 1.

Se puede observar una relación lineal entre la absorbancia medida a 560 nm y la cantidad de aceite de girasol ozonizado en $\mu\text{g}/\text{ensayo}$ para las cinco muestras a diferentes dosis de ozono aplicada. Este resultado demuestra la factibilidad del uso de esta técnica, para ser empleada en la cuantificación de hidroperóxidos en el aceite de girasol ozonizado, en las cantidades de 2 a 17 μg de aceite por cada ensayo, debido a la relación lineal obtenida entre ambos parámetros, la cual fue demostrada estadísticamente con coeficientes de correlación y de determinación superiores a 99 % y 98% respectivamente. La relación lineal obtenida en el ensayo puede ser debido a la completa solubilidad entre el aceite de girasol ozonizado y el reactivo de OFX para el total desarrollo de la reacción; esto coincide con lo reportado por Nourooz-Zadeh y colaboradores (Nourooz-Zadeh, 1995) para el aceite de girasol refinado hasta cantidades de 20 mg/ensayo, valores muy superiores a los obtenidos en este trabajo, debido a las diferentes concentraciones de HPT existentes entre el aceite de girasol refinado y el aceite de girasol ozonizado.

Para la determinación del coeficiente de extinción molar de $6,4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ se emplearon diferentes concentraciones del patrón terc-butilhidroperóxido en aceite de girasol refinado utilizando la técnica de OFX. Este valor no coincide con el coeficiente de ex-

tinción molar ($4,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) obtenido por Jiang y colaboradores en 1991 (Jiang, 1991), debido a que utilizaron como sustancia patrón el peróxido de hidrógeno. En este trabajo se escogió como sustancia patrón el terc-butilhidroperóxido, debido a su similitud estructural con los hidroperóxidos (hexahidroperóxidos, nonahidroperóxidos, decahidroperóxidos) que se forman durante la reacción de ozonización del aceite de girasol.

Las concentraciones de HPT obtenidas en las cinco muestras de aceite de girasol ozonizado a diferentes dosis de ozono aplicada (tabla 1) y determinadas utilizando la técnica de OFX, mostraron valores extremadamente elevados (235 a 1138 mmol/kg) en comparación con la concentración de HPT obtenida en el aceite de girasol refinado comestible ($2,39 \pm 0,8$ mmol/kg), mediante el empleo de esta misma técnica por Nourooz-Zadeh y colaboradores (Nourooz-Zadeh, 1995). Este resultado ha sido esperado debido a que durante la reacción de ozonización de los ácidos grasos insaturados de los distintos triglicéridos que componen los aceites vegetales, se obtienen distintas especies peroxídicas como los hidroperóxidos, ozónidos, peróxido de hidrógeno, diperoxidos cíclicos y otros poliperóxidos, donde la naturaleza y concentración de estas especies va a depender de las condiciones específicas en que se realiza la ozonización (Bailey, 1978), y son cuantificadas globalmente mediante la determinación del IP. Por esta razón se obtienen los elevados valores de HPT, como una medida de los compuestos mayoritarios obtenidos en el aceite de girasol ozonizado y que se encontraban en pequeñas cantidades en el aceite de girasol refinado.

Los valores obtenidos de HPT en las muestras de aceite de girasol ozonizado, son mayores que los de IP. Esto es debido a que en 2 minutos de reacción no reaccionan todos los peróxidos presentes en la muestra ozonizada, como por ejemplo los peróxidos poliméricos y los peróxidos de mayor peso molecular que los triglicéridos, obteniéndose un valor mucho menor al real. Todas las especies peroxídicas reaccionan en 24 horas obteniéndose un valor mucho mayor que el IP cuantificado a los dos minutos (Ledea, 2004). El tiempo de reacción constituye una desventaja del método IP.

El empleo de esta técnica permite evaluar selectivamente el contenido de hidroperóxidos en el aceite de girasol ozonizado, lo cual no es posible mediante el empleo del método yodométrico, el cual cuantifica todas las especies peroxídicas presentes en el aceite de girasol refinado y en el aceite de girasol ozonizado. Esto constituye una de las mayores ventajas de la técnica de OFX con respecto al método yodométrico. Otra de las ventajas es que en el método de OFX reaccionan todos los hidroperóxidos presentes en la muestra en el tiempo establecido en la técnica (1 hora con cinco minutos), mientras que

en el método yodométrico reaccionan los peróxidos presentes en la muestra según el tiempo establecido de la técnica (1 minuto, 2 minutos, 5 minutos, 24 horas), el cual aumenta en correspondencia con el tiempo de reacción. (B.P., 2000; PANREAC, 1999; NC 85-04, 1981, Ledea 2004).

Se evaluó la repetibilidad del método de OFX y los coeficientes de variación obtenidos (tabla 1) fueron inferiores al coeficiente máximo ($CV = 16$) aceptado según Horwitz, para un porcentaje de analito en la muestra de 0,0001 (Kolthoff, 1975). Por esta razón el método tiene una adecuada repetibilidad. También fue evaluada la precisión intermedia obteniéndose dos curvas de calibración estadísticamente idénticas realizadas por diferentes analistas en diferentes días.

Con el objetivo de comparar ambas técnicas para la determinación de HPT por la técnica de OFX y la determinación de peróxidos por el ensayo yodométrico, se realizó una correlación de ambos ensayos con las muestras de aceite de girasol ozonizado a diferentes dosis de ozono aplicada. Esta correlación resultó ser lineal con un coeficiente de correlación de 99,30 % y de determinación de 98,60 %. Mediante la ecuación de la recta obtenida ($HPT = 1.3185 IP + 12.023$) es posible determinar uno de estos parámetros, en los intervalos de concentraciones estudiados. Esto además permite evaluar la factibilidad de utilizar en el aceite de girasol ozonizado, la técnica de OFX, al ser comparada con la técnica yodométrica, muy conocida en la literatura internacional para la determinación de peróxidos en aceites y grasas.

5. CONCLUSIONES

- La técnica espectrofotométrica OFX permitió cuantificar hidroperóxidos totales en aceite de girasol ozonizado.
- Se demostró una relación lineal entre la determinación de peróxidos por el ensayo yodométrico (IP) y la determinación de hidroperóxidos totales por la técnica de OFX, lo cual permite evaluar ambos parámetros.

BIBLIOGRAFÍA

- Bailey P.S. 1978. Ozonization in Organic Chemistry, Vol. 1 y 2, Academic Press, New York, USA.
- British Pharmacopeia. 2000. Peroxide Value, Apéndices XF, 1B.
- Castillo B, González R. 1996. Protocolo de validación de métodos analíticos para la cuantificación de fármacos. *Rev. Cubana Farm.* **30**(1), 43.
- Castro M, Gascón S, Pujol M, Sans J, Vicente L. 1989. Validación de métodos analíticos. Sección Catalana de la Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI), 1-94.
- Díaz M, Álvarez I, Vélez H, Hernández F, Ledea O, Moleiro J. 1997. ^1H NMR studies of the ozonation of methyl oleate. *Boletín Sociedad Chilena de Química*, **42**, 349.

- Hicks M, Gebicki JMA. 1979. Spectrophotometric method for determination of lipid hydroperoxides. *Anal. Biochem.* **99**, 249-253.
- International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). 1964. Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Soaps **II**, D.13.
- Jiang ZY, Wolff SP, Woollard ACS. 1992. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xilenol orange: Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids* **26**, 853-856.
- Jiang ZY, Hunt JV, Wolff SP. 1991. Ferrous ion oxidation in the presence of xilenol of xilenol orange for detection of lipid hydroperoxides in low density lipoproteins. *Anal. Biochem.* **202**, 384-389.
- Kolthoff IM, Sandell EB, Meechan EJ, Bruckenstein S. 1975. Análisis Químico Cuantitativo, 4ª edición, Editorial Nigar S.R.L., Buenos Aires.
- Ledeo LO. 2003. Estudio de la composición química del aceite de girasol ozonizado "OLEOZON[®]", Tesis Doctoral. Ciudad de La Habana, Cuba.
- Ledeo O, Díaz M, Vargas E, Martínez G, Hernández R, Gómez M, Fernández H, Hernández D. 2004. Variation of OLEOZON iodometric peroxide value with the measurement time. 4^o Simposio Internacional de Aplicaciones del Ozono. La Habana.
- Lezcano I, Núñez N, Gutierrez M, Molerio MG, Regüeiferos J., Diaz W. 1996. Actividad in vitro del aceite de girasol ozonizado (OleoZón) frente a diferentes especies bacterianas. *Revista CENIC, Ciencias Biológicas* **27**(1-3), 46-49.
- NC 85-04. 1981. Aceites y grasas comestibles. Métodos de ensayo.
- Nourooz-Zadeh J, Tajaddini-Sarmadi J, Birlouez-Aragon I, Wolff S. 1995. Measurement of hydroperoxides in edible oils using the ferrous oxidation in xilenol orange assay. *J. Agric. Food Chem.* **43**, 17-21.
- Panreac Química SA. 1999. Métodos Analíticos en Alimentarias. Métodos Oficiales de Análisis. Aceites y Grasas, 15.
- Thielmann K. 1973. Principios de Metodología en Bioquímica Clínica, Editorial Organismos, Instituto Cubano del Libro, Ciudad de la Habana.
- Wolff SP. 1994. Ferrous ion oxidation in presence of ferric ion indicator xilenol orange for measurement of hidroperoxides. *Methods Enzimol.* **233**, 182-189.

Recibido: Marzo 2004
Aceptado: Enero 2005