

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

**DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA, TOXICOLOGÍA Y
MEDICINA LEGAL**



**“EFECTOS TÓXICOS DERIVADOS DE LA INGESTIÓN
SUBCRÓNICA DE ACEITE DE OLIVA SOMETIDO A DIVERSOS
GRADOS DE FRITURA EN RATA”**

**Memoria que presenta la Licenciada ISABEL CLARA ROLLÁN
DELGADO para optar al título de Doctor por la Universidad de Sevilla**

Sevilla, 2016

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

AREA DE TOXICOLOGÍA
C/ Profesor García González, nº 2
41012 Sevilla (España)
Teléfono: 954 55 67 62
Fax: 954 55 64 22



D^ª ANA MARÍA CAMEÁN FERNÁNDEZ, Directora del Departamento de Nutrición y Bromatología, Toxicología y Medicina Legal de la Universidad de Sevilla,

CERTIFICA: Que la Tesis Doctoral titulada “EFECTOS TÓXICOS DERIVADOS DE LA INGESTA SUBCRÓNICA DE ACEITE SOMETIDO A DIVERSOS GRADOS DE FRITURA EN RATA”, presentada por la Lda. D^ª ISABEL CLARA ROLLÁN DELGADO para optar al grado de Doctor, ha sido realizada en el Departamento de Nutrición y Bromatología, Toxicología y Medicina Legal de la Universidad de Sevilla, reuniendo los requisitos exigidos.

Y para que así conste, firmo el presente certificado en Sevilla, Octubre de 2015

Fdo. Ana M^ª Cameán Fernández

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

AREA DE TOXICOLOGÍA

C/ Profesor García González, nº 2

41012 Sevilla (España)

Teléfono: 954 55 67 62

Fax: 954 55 64 22



D^ª ANA MARÍA CAMEÁN FERNÁNDEZ, Catedrática del Departamento de Nutrición y Bromatología, Toxicología y Medicina Legal de la Universidad de Sevilla, D^ª ÁNGELES JOS GALLEGO, Profesora Titular del Departamento de Nutrición y Bromatología, Toxicología y Medicina Legal de la Universidad de Sevilla y D^ª SILVIA PICHARDO SÁNCHEZ, Profesora Titular del Departamento de Nutrición y Bromatología, Toxicología y Medicina Legal de la Universidad de Sevilla

CERTIFICAN: Que la Tesis Doctoral titulada “EFECTOS TÓXICOS DERIVADOS DE LA INGESTA SUBCRÓNICA DE ACEITE SOMETIDO A DIVERSOS GRADOS DE FRITURA EN RATA”, ha sido realizada por la Lda. D^ª ISABEL CLARA ROLLÁN DELGADO en el Departamento de Nutrición y Bromatología, Toxicología y Medicina Legal de la Universidad de Sevilla, bajo su dirección y que reúne, a su juicio, las condiciones requeridas para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla.

Y para que así conste, firmamos en Sevilla, Octubre 2015.

Directora

Fdo. Ana M^ª Cameán

Directora

Fdo. Ángeles Jos

Directora

Fdo. Silvia Pichardo

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

AREA DE TOXICOLOGÍA

C/ Profesor García González, nº 2

41012 Sevilla (España)

Teléfono: 954 55 67 62

Fax: 954 55 64 22



Este trabajo ha sido realizado en el Área de Toxicología del Departamento de Nutrición y Bromatología, Toxicología y Medicinal Legal de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla, y se ha financiado con los siguientes fondos:

- Proyecto de excelencia AGR-678 de la Junta de Andalucía: Trazabilidad y Seguridad Alimentaria del Aceite de Oliva (Investigador Principal: Ramón Moreno Aparicio).
- Grupo CTS-358 del P.A.I.D.I. (Investigadora Principal: Ana M^a Cameán Fernández).

“Llevas tanto tiempo en mi vida, que no recuerdo nada más”

(Teniente Ripley. Alien 3)

Agradecimientos

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que han participado en la elaboración de este trabajo y a las que aún no estando relacionadas con la Tesis, han estado a mi lado en algún momento:

En primer lugar, quería agradecer a la Dra. Ana M^a Cameán Fernández, por permitirme estar en su laboratorio, por instruirme con sus comentarios y sobre todo, por su paciencia, ya que ha sido un trabajo con largas interrupciones.

A la Dra. Silvia Pichardo, como codirectora del trabajo de Tesis, por su apoyo, supervisión y sugerencias durante el proceso.

Quería hacer una mención especial a la Dra. Ángeles Jos, ya que como codirectora de tesis, me ha brindado su tiempo, su experiencia en el campo de la toxicología y más de una revisión/discusión en persona, por teléfono o por mail. Quisiera agradecer a Nines, pero ahora ya como amiga, además de todo lo anterior, su ayuda con algunos procedimientos experimentales, por el impulso y la energía que me ha transmitido en los momentos de bajón y porque hemos vivido muchas cosas juntas durante todo este tiempo... te admiro y te aprecio un montón.

A los miembros del laboratorio con los que coincidí durante ese periodo: las Dras. Isabel Moreno, Anabel Prieto y María Puerto; las dos

últimas estudiantes de doctorado por aquel entonces, ayudándome en la parte experimental.

Quiero agradecer, de forma muy especial, la colaboración de la Dra. Carmen Dobarganes, por el tratamiento de los aceites utilizados en la elaboración de las dietas, que representa, sin duda, la base de este estudio, y también, a la Dra. Rosario Moyano y al Dr. Alfonso Blanco, por su inestimable ayuda con los estudios histopatológicos. También quisiera mencionar al personal de la Unidad de Bioquímica Clínica del Hospital Universitario Virgen Macarena de Sevilla, por su contribución a la evaluación bioquímica del suero sanguíneo.

Me gustaría hacer una mención especial al Dr. Jose Luis Gómez-Skarmeta, porque muchas de las cosas que he aprendido en Ciencia, fue gracias a él, porque confió en mí, y porque me ayudó en muchas ocasiones. Fue de las primeras personas con las que trabajé cuando “retorné a la ciencia” y los comienzos nunca se olvidan. Gracias por todo.

A mis compañeros del CNIC: Teresa, Julio, Melisa, Sergio, Claudio, Mariajo, Jesús, Aurora... por hacerme sentir tan a gusto y por contagiarme vuestro entusiasmo por la ciencia. Sois un equipo espectacular y me encanta aprender día a día de vosotros. Gracias también por todo lo que habéis hecho por mí, sobretodo en estos últimos meses, para que pudiera centrarme en terminar la Tesis: por esas camadas que habéis sacado, por esos reactivos que habéis preparado en mi lugar, por esas sesiones de microinyección transferidas...y sobretodo, ¡¡gracias por los ánimos!!.

Agradecer al Dr. Miguel Manzanares por darme la oportunidad de formar parte de su laboratorio; ha sido todo un regalo. Por dejarme hacer y deshacer, por enseñarme tanto con sus comentarios, y sobre todo, por darme tantas facilidades para terminar este proyecto que tenía entre manos. Admiro tanto tu calidad científica como tu calidad humana.

A Fernando, porque aunque hubiera hecho las mismas cosas en la vida, no hubiera sido lo mismo sin ti. Porque me diste fuerzas para comenzar esta aventura y porque me has apoyado en todo momento. Porque durante la tesis has sido apoyo, corrector de estilo, experto informático y, sobretodo, COMPAÑERO. No obstante, sé que lo has hecho porque tenías muchas ganas de convertirte en “Doctor consorte”.

A mis hijas: Inés y Clara porque, sobretodo en esta última etapa, tuvieron que soportar los nervios de mamá y algunos días sin vernos...no tenéis ni idea de la inyección de energía que suponen vuestros besos y abrazos.

A mi padre y a mi madre, porque hicieron lo posible y lo imposible por dar a cada uno de sus hijos una buena formación y educación. Cada uno a su manera ha contribuido a que este trabajo sea posible. ¡GRACIAS por todo!. Os quiero un montón.

Al resto de mi familia, especialmente a Fede, Pili, Juan y Reme, porque cada uno, en su medida, ha colaborado a que este proyecto sea posible (algunos incluso sin saberlo). Cuando uno es feliz, y ellos contribuyen a ello, uno es capaz de comerse el mundo.

Y por supuesto, gracias a las ratas Wistar que dieron su vida por la ciencia...

Índice

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1.	EL ACEITE DE OLIVA	1
1.1.1.	Historia del aceite de oliva	1
1.1.2.	Producción y consumo de aceite de oliva	3
1.1.3.	Clasificación de aceites. Categorías y definiciones.....	7
1.1.4.	Composición del aceite de oliva.....	11
1.1.5.	Parámetros de calidad	24
1.1.6.	Aspectos nutricionales	26
1.1.7.	El aceite de oliva según la variedad de la aceituna	29
1.2.	LA TÉCNICA DE FRITURA EN BAÑO DE ACEITE	33
1.2.1.	Norma de calidad para aceites y grasas calentados.....	39
1.2.2.	Efectos tóxicos de los compuestos de alteración del aceite	41
1.3.	LAS GRASAS DE LA DIETA. SALUD Y ENFERMEDAD	44
1.4.	ESTRÉS OXIDATIVO	46
1.5.	SISTEMAS DE DEFENSA ANTIOXIDANTE.....	56
1.5.1.	Sistemas enzimáticos	57
1.5.1.1.	Enzimas antioxidantes primarias.....	57
1.5.1.2.	Enzimas antioxidantes secundarias.....	59
1.5.2.	Sistemas no enzimáticos	60
1.5.2.1.	Antioxidantes hidrofílicos.....	60
1.5.2.2.	Antioxidantes lipofílicos	61
2.	OBJETIVOS.....	63
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	65
3.1.	EQUIPOS Y MATERIALES DE USO GENERAL	65
3.1.1.	Dispositivos utilizados.....	65
3.1.2.	Material fungible.....	65
3.2.	REACTIVOS UTILIZADOS.....	66
3.3.	TRATAMIENTO DE ACEITES EMPLEADOS EN LA ELABORACIÓN DE LAS DIETAS	68
3.4.	EL MODELO EXPERIMENTAL	70
3.5.	EL DISEÑO EXPERIMENTAL	71

3.6.	PREPARACIÓN DE LAS DIETAS.....	72
3.7.	SACRIFICIO DE LOS ANIMALES. TOMA DE MUESTRAS	76
3.7.1.	Tratamiento de la sangre	78
3.7.2.	Tratamiento de las muestras de órganos.....	78
3.7.3.	Protocolo de homogeneización de órganos.....	79
3.8.	DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS	80
3.8.1.	Órganos.....	80
3.8.1.1.	Determinación de la concentración de proteínas totales	80
3.8.1.2.	Estado de peroxidación lipídica (LPO)	82
3.8.1.3.	Determinación de marcadores de estrés oxidativo.....	84
3.8.1.3.1.	Determinación de la actividad SOD.....	84
3.8.1.3.2.	Determinación de la actividad CAT	87
3.8.1.3.3.	Determinación de la actividad GPx	89
3.8.1.3.4.	Determinación de la actividad GR.....	90
3.8.2.	Sangre	91
3.8.2.1.	Determinación de la concentración de hemoglobina	91
3.8.2.2.	Estado de peroxidación lipídica (LPO)	92
3.8.2.1.	Determinación de marcadores de estrés oxidativo.....	93
3.8.2.1.1.	Determinación de la actividad GPx	93
3.9.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	94
4.	RESULTADOS	95
4.1.	EVOLUCIÓN DEL PESO Y CONSUMOS	95
4.2.	ANATOMÍA PATOLÓGICA.....	101
4.3.	DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS	116
4.3.1.	Órganos.....	116
4.3.2.	Sangre	129
5.	DISCUSIÓN.....	137
6.	CONCLUSIONES	151
7.	BIBLIOGRAFÍA	153

Abreviaturas y acrónimos

8-OHdG	8-hidroxi-desoxiguanosina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ALP-AMP	Fosfatasa alcalina
ALT	Alanina aminotransferasa
Arg	Arginina
AST	Aspartato amino transferasa
ATB	Ácido tiobarbitúrico
ATB	Ácido tiobarbitúrico
BHT	Butilhidroxitolueno
BSA	Albúmina de suero bovino
CAT	Catalasa
CBB	Reactivo Coomassie Brilliant Blue
CE	Comunidad Europea
CK-Nac	Creatina quinasa
COI	Consejo Oleícola Internacional
CPs	Compuestos Polares
CSIC	Consejo Superior de Investigaciones Científicas
DG	Diglicéridos
DOP	Denominación de Origen Protegida
ECI	Eficacia de conversión de la ingesta
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ERO	Especie Reactiva de Oxígeno
FapyG	2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidina
G6PDH	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
γGCS	Glutamil cisteinil sintetasa
GGT	Glutamil transpeptidasa
GPx	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
IP	Inhibidor de proteasa o antitripsina
L	Ácido linoleico
LDLP	Lipoproteínas de baja densidad
LPO	Peroxidación lipídica
Lys	Lisina

M.E.	Microscopio electrónico
M.O.	Microscopio óptico
MAPA	Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino
MDA	Malondialdehído
MUFAs	Ácidos Grasos Monoinsaturados
O	Ácido oleico
OOL	Triglicérido oleico:oleico:linoleico
OOO	Triglicérido oleico:oleico:oleico
oxTGM	Monómeros de triglicéridos oxidados
P	Ácido palmítico
POL	Triglicérido palmítico:oleico:linoleico
POO	Triglicérido palmítico:oleico:oleico
PPP	Triglicérido palmítico:palmítico:palmítico
Pro	Prolina
PSP	Triglicérido palmítico: esteárico:palmítico
PUFAs	Ácidos Grasos Poliinsaturados
RD	Real Decreto
S	Ácido esteárico
SCA	Sociedad Comanditaria por Acciones
SDS	Lauril sulfato sódico
SFA	Ácidos Grasos Saturados
SOD	Superóxido dismutasa
SOO	Triglicérido esteárico:oleico:oleico
SPS	Triglicérido esteárico:palmítico:esteárico
SSS	Triglicérido esteárico:esteárico:esteárico
TEP	1,1,3,3-tetraetoxipropano
TGP	Polímeros de triglicéridos
Thr	Treonina
TO	Dímeros de triglicéridos y polímeros
TP	Tiempo de protrombina
UNESCO	Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura
VLDLs	Lipoproteínas de muy baja densidad

Lista de figuras

Figura 1 Aceites de oliva virgen con Denominaciones de Origen Protegidas de España.	10
Figura 2 Proceso de reducción del oxígeno.....	47
Figura 3 Efectos principales de las especies reactivas de oxígeno	49
Figura 4 Principales sistemas enzimáticos antioxidantes celulares.....	56
Figura 5 Ciclo del GSH	59
Figura 6 Sistema glutatión reducido/oxidado (GSH/GSSG).....	60
Figura 7 Medidor de la calidad del aceite	69
Figura 8 Ratas Wistar macho utilizadas como modelo experimental	71
Figura 9 Esquema del diseño experimental	72
Figura 10 Formato o presentación de la dieta suministrada a las ratas.....	74
Figura 11 Extracción de sangre por punción cardiaca.....	77
Figura 12 Disección de una rata	77
Figura 13 Evolución de pesos en los distintos grupos por tipos de dieta.....	96
Figura 14 Incremento de pesos en los distintos grupos por tipos de dieta.....	97
Figura 15 Consumo de agua en los distintos grupos por tipos de dieta.....	98
Figura 16 Consumo de alimento en los distintos grupos por tipos de dieta	99
Figura 17 Eficacia de conversión de la ingesta en los distintos grupos experimentales	100
Figura 18 Peso de la aorta en los distintos grupos experimentales	101
Figura 19 Índice somático en aorta en los distintos grupos experimentales	102
Figura 20 Alteraciones del tejido de la aorta (microscopio óptico).....	104
Figura 21 Peso del corazón en los distintos grupos experimentales.....	105
Figura 22 Índice cardiosomático en los distintos grupos experimentales.....	106
Figura 23 Alteraciones del tejido cardíaco (microscopio óptico)	108
Figura 24 Alteraciones del tejido cardíaco (microscopio electrónico)	109
Figura 25 Peso del riñón en los distintos grupos experimentales	110
Figura 26 Índice somático (riñón) y comparación entre lotes experimentales	111
Figura 27 Alteraciones del tejido renal (microscopio óptico).....	112
Figura 28 Peso del hígado en los distintos grupos experimentales.....	113
Figura 29 Índice hepatosomático en los distintos grupos experimentales	114
Figura 30 Alteraciones del tejido hepático (microscopio óptico).....	115
Figura 31 Peroxidación lipídica en corazón (expresada en nmoles/g)	116
Figura 32 Actividad SOD en corazón (expresada en U/mg proteína).	117
Figura 33 Actividad CAT en corazón (expresada en U/mg proteína).....	118
Figura 34 Actividad GPx en corazón (expresada en U/mg proteína).....	119
Figura 35 Actividad GR en corazón (expresada en U/mg proteína)	120
Figura 36 Peroxidación lipídica (LPO) en riñón (expresada en nmoles/g tejido).....	121
Figura 37 Actividad SOD en riñón (expresada en U/mg proteína)	122
Figura 38 Actividad CAT en riñón (expresada en U/mg proteína).....	123
Figura 39 Actividad GPx en riñón (expresada en U/mg proteína).....	124
Figura 40 Actividad GR en riñón (expresada en U/mg proteína)	125
Figura 41 Peroxidación lipídica en hígado (expresada en nmoles/g tejido)	126

Figura 42 Actividad SOD en hígado (expresada en U/mg proteína). 127

Figura 43 Actividad CAT en hígado (expresada en U/mg proteína) 128

Figura 44 Actividad GPx en hígado (expresada en U/mg proteína)..... 128

Figura 45 Actividad GR en hígado (expresada en U/mg proteína). 129

Figura 46 Peroxidación lipídica en plasma (expresada en nmoles/mg de proteína). 130

Figura 47 Actividad SOD en sangre (expresada en U/mg proteína). 131

Figura 48 Actividad CAT en sangre (expresada en U/mg proteína)..... 132

Figura 49 Actividad GPx en sangre (expresada en U/mg). 133

Figura 50 Actividad GR en sangre (expresada en U/mg)..... 134

Lista de tablas

Tabla 1 Producción de aceite de oliva a nivel mundial (1000 toneladas). Fuente: COI (2015)....	4
Tabla 2 Producción de aceite de oliva en Europa (1000 toneladas). Fuente: COI (2015).....	5
Tabla 3 Consumo de aceite de oliva a nivel mundial (1000 toneladas). Fuente: COI (2015)	6
Tabla 4 Consumo de aceite de oliva en Europa (1000 toneladas). Fuente: COI (2015)	7
Tabla 5 Distribución de ácidos grasos en el aceite de oliva. Fuente: COI (2015)	13
Tabla 6 Valores máximos de ceras según categoría del aceite (mg/kg). Fuente COI (2015)	15
Tabla 7 Límites para los esteroides (COI, 2015)	18
Tabla 8 Compuestos de la fracción insaponificable del aceite de oliva (COI, 2015).....	24
Tabla 9 Límites establecidos por la Unión Europea para clasificar un aceite (COI, 2015)	25
Tabla 10 Tipos de alteraciones de aceites y grasas	41
Tabla 11 Resultados del análisis de los compuestos polares	70
Tabla 12 Composición de las dietas experimentales (g/kg)	73
Tabla 13 Análisis bioquímico en plasma de los distintos grupos experimentales	135

1. INTRODUCCIÓN

1.1. EL ACEITE DE OLIVA

El aceite de oliva es un aceite vegetal de uso principalmente culinario; aunque también se ha utilizado –y se utiliza– con fines cosméticos, medicinales, religiosos e industriales. Según el Consejo Oleícola Internacional (COI), el aceite de oliva se define como “el aceite procedente del fruto del olivo (*Olea europaea sativa* Hoffm. y Link), con exclusión de los aceites obtenidos por disolventes o por procedimientos de reesterificación y de toda mezcla con aceites de otra naturaleza”.

Este aceite se puede comercializar bajo distintas denominaciones, siendo el aceite de oliva virgen “el aceite obtenido del fruto del olivo únicamente por procedimientos mecánicos o por otros medios físicos en condiciones, especialmente térmicas, que no produzcan la alteración del aceite, que no haya tenido más tratamiento que el lavado, la decantación, la centrifugación y el filtrado”.

El aceite se extrae de aceitunas maduras de entre seis y ocho meses, justo en el momento que contienen su máxima cantidad de aceite (lo que suele ocurrir a finales de otoño). Las aceitunas se someten a una primera presión con el objetivo de extraer su zumo. La calidad del aceite dependerá, en gran medida, del procesado posterior, de ahí que los productores vigilen estos pasos con sumo cuidado. La calidad del aceite de oliva se juzgará por sus propiedades organolépticas y por su contenido en ácidos grasos libres.

1.1.1. Historia del aceite de oliva

Se conocen usos del árbol del olivo ya desde el Paleolítico Superior (12000 a.C.); no obstante, el origen de la producción de

aceite de oliva se estima en el 4000 a.C.. En la zona del Creciente Fértil (que va desde los ríos Tigris y Éufrates hasta el Nilo), se realizó una mezcla entre dos variedades (una africana y otra oriental) para obtener una especie con frutos grandes de la que extraer su aceite. En excavaciones realizadas en la zona se han encontrado molinos de aceite. Se sospecha que las primeras plantaciones se realizaron en la extensa área que va desde Siria a Canaán (desde el 5000 a.C. hasta comienzos del 3000 a.C.) y que este uso de la aceituna nació con la agricultura.

En Egipto, hacia el 2000 a.C., se comenzó a usar el aceite de oliva con fines cosméticos. Lo importaban desde Creta. Este aceite sería un producto común en el Mediterráneo, junto con el pan y el vino (Alan, 1999).

Los fenicios, el gran pueblo comerciante de la antigüedad mediterránea, llevó el cultivo del olivo a las costas del sur de la Península Ibérica, la actual Andalucía, hacia el siglo XI a.C.. Pronto dicha tierra habría de convertirse en una de las principales zonas de producción del oro líquido. Fueron los fenicios los que así mismo introdujeron la producción oleícola en el Magreb y Cerdeña.

Con Roma, el consumo de aceite de oliva llega a los confines del imperio. El comercio del aceite tuvo un gran desarrollo. Las costas de Tripolitania (Libia occidental), la provincia Bética y el Mediterráneo francés fueron los tres grandes centros de producción de aceite durante los siglos del imperio.

El predominio andaluz y jienense en la producción mundial de aceite de oliva proviene de la época de los establecimientos del Imperio Romano en Hispania. Durante los siglos de esplendor del Imperio Romano, la Bética, fue la principal provincia productora de aceite de oliva. De esta zona provienen más del 90% de las ánforas que se encontraron en el Monte Testaccio (monte de tiestos), en Roma. Se trataba de una colina artificial construida a base de ánforas que contenían el tributo de todas las provincias a la ciudad imperial

(siglos I y III d.C.). Los habitantes de esta ciudad, lo consideraban símbolo del poder de la Roma antigua y de la bonanza económica de su gran imperio.

En la antigüedad, y al igual que en la actualidad, el centro de la producción andaluza se encontraba en el valle del Guadalquivir, si bien entonces el peso mayor recaía algo más al oeste que actualmente.

1.1.2. Producción y consumo de aceite de oliva

El aceite de oliva no supone una gran producción a nivel mundial, si se compara con otros aceites vegetales, como pueden ser: el aceite de soja, el de palma, el de colza o el de girasol. Incluso la producción mundial de mantequilla (grasa de origen animal) es más de tres veces superior a la producción de aceite de oliva.

Histórica y culturalmente, el aceite de oliva ha sido un producto muy ligado al área del Mediterráneo. España, y en menor medida, Italia y Grecia, acaparan las tres cuartas partes de la producción mundial.

Al igual que la producción mundial, el consumo de los aceites de oliva está prácticamente concentrado en las regiones productoras; el 71% está centrado en la CE, del cual un 93% corresponde a los tres principales países productores. España, Italia y Grecia. Destacan, por otro lado, la baja tasa de consumo de aceite de oliva en Túnez y Turquía, con respecto al consumo en otros países productores y exportadores. Este hecho se interpreta como una consecuencia directa de sus políticas económicas, dirigidas a promover la exportación del oro líquido.

En términos *per cápita*, los países productores son también los principales consumidores de aceite de oliva.

Aunque el aceite de oliva sólo representa el 3% del aceite vegetal consumido en el mundo, en los principales países productores

(España, Italia, Grecia y Túnez) esta cifra alcanza el 30%. Esto sugiere, entre otros aspectos, que existe posibilidad de aumentar el consumo de los aceites de oliva a la vista de sus probadas propiedades nutricionales y terapéuticas.

Las siguientes tablas muestran los datos de producción de aceite de oliva, tanto a nivel mundial como a nivel europeo. Los datos muestran los resultados del periodo 2008 a 2014 y la previsión de 2015:

	2008/9	2009/0	2010/1	2011/2	2012/3	2013/4	Previsión 2014/5	%
Albania	6,0	5,0	8,0	7,0	12,0	10,5	12,0	0,3%
Argelia	61,5	26,5	67,0	39,5	66,0	44,0	44,0	1,7%
Argentina	23,0	17,0	20,0	32,0	17,0	30,0	6,0	0,8%
Croacia	6,0	5,0	5,0	4,0	4,0			0,2%
Egipto	5,0	3,0	4,0	9,0	16,5	7,0	21,0	0,3%
Irán	4,5	4,0	4,0	7,0	3,5	5,0	9,0	0,2%
Israel	9,0	3,5	12,5	13,0	18,0	15,0	17,5	0,4%
Jordania	18,5	17,0	27,0	19,5	21,5	30,0	35,0	0,8%
Líbano	12,0	9,0	32,0	14,0	14,0	20,5	16,5	0,6%
Libia	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	0,5%
Marruecos	85,0	140,0	130,0	120,0	100,0	120,0	110,0	3,9%
Montenegro	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,0%
Siria	130,0	150,0	180,0	198,0	175,0	165,0	50,0	5,6%
Túnez	160,0	150,0	120,0	182,0	220,0	70,0	260,0	5,1%
Turquía	130,0	147,0	160,0	191,0	195,0	190,0	190,0	5,7%
UE	1939,0	2224,5	2209,0	2395,0	1461,5	2476,5	1532,0	71,7%
Uruguay						0,5	1,5	0,1%
Arabia Saudí	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	0,5%
Australia	15,0	18,0	18,0	15,5	9,5	18,0	12,0	0,5%
Chile	8,5	12,0	16,0	21,5	15,0	15,0	24,0	0,1%
USA	3,0	3,0	4,0	4,0	4,0	5,0	4,0	0%
Palestina	20,0	5,5	25,0	15,5	15,5	15,5	15,5	0,5%
Otros	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	14,5	14,5	0,5%
Total producción aceite de oliva mundial (1000 toneladas)								100%

Tabla 1 Producción de aceite de oliva a nivel mundial (1000 toneladas). Fuente: COI (2015)

	2008/9	2009/0	2010/1	2011/2	2012/3	2013/4	Previsión 2014/5	%
Chipre	2,8	4,2	6,5	6,5	5,6	5,6	5,6	0,2%
España	1030,0	1401,5	1391,9	1615,0	618,2	1775,8	825,7	61,6%
Francia	7,0	5,7	6,1	3,2	5,1	4,9	5,0	0,3%
Grecia	305,0	320,0	301,0	294,6	357,9	131,9	300,0	13,5%
Italia	540,0	430,0	440,0	399,2	415,5	461,2	302,5	21,1%
Portugal	53,4	62,5	62,9	76,2	59,2	91,6	90,0	3,2%
Eslovenia	0,5	0,7	0,7	0,5	0,2	0,6	0,2	0,0%
Total producción aceite de oliva mundial (1000 toneladas)								100%

Tabla 2 Producción de aceite de oliva en Europa (1000 toneladas). Fuente: COI (2015)

Las siguientes tablas muestran los datos de consumo de aceite de oliva, tanto a nivel mundial como a nivel europeo. Los datos muestran los resultados del período 2008 a 2014 y la previsión de 2015:

	2008/9	2009/0	2010/1	2011/2	2012/3	2013/4	Previsión 2014/5	%
Albania	7,0	6,0	9,0	8,0	13,0	11,5	13,0	0,3%
Argelia	55,0	33,5	59,0	42,5	60,5	48,5	45,5	1,7%
Argentina	5,0	5,0	5,5	6,0	6,0	6,0	6,0	0,2%
Croacia	7,0	6,5	7,0	6,0	6,0			0,2%
Egipto	5,0	7,0	5,0	7,5	12,0	8,5	15,0	0,3%
Irán	7,0	6,5	7,5	11,0	8,5	10,0	12,5	0,3%
Iraq	0,0	8,5	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	0,2%
Israel	17,0	16,5	17,0	15,5	19,5	20,0	19,0	0,6%
Jordania	23,5	20,0	20,0	17,0	20,0	27,0	30,0	0,7%
Líbano	20,0	9,5	20,0	20,0	20,0	20,0	18,0	0,6%
Libia	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	0,5%
Marruecos	70,0	90,0	100,0	122,0	129,0	132,0	120,0	3,6%
Montenegro	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,0%
Siría	110,0	120,5	130,5	135,5	160,5	95,0	60,0	4,2%
Túnez	21,0	30,0	30,0	35,0	40,0	30,0	50,0	1,0%
Turquía	108,0	110,0	131,0	150,0	150,0	160,0	130,0	4,5%
UE	1856,0	1846,0	1866,5	1790,0	1621,0	1717,0	1591,5	59,8%
Arabia	6,5	6,5	15,0	16,0	21,0	22,0	22,0	0,5%

	2008/9	2009/0	2010/1	2011/2	2012/3	2013/4	Previsión 2014/5	%
Saudí								
Australia	37,0	44,0	44,0	40,0	37,0	44,0	37,0	1,4%
Brasil	42,0	50,5	61,5	68,0	73,0	72,5	72,0	2,1%
Canadá	30,0	37,0	40,0	39,5	37,0	40,5	37,5	1,3%
Chile	7,5	9,0	10,0	13,0	6,0	5,5	6,0	0,3%
USA	256,0	258,0	275,0	300,0	287,0	301,5	290,0	9,4%
Japón	30,0	40,5	35,5	43,0	51,0	54,0	51,0	1,4%
Méjico	9,5	9,0	10,0	11,5	14,0	14,0	14,0	0,4%
Noruega	3,0	3,5	3,0	3,0	3,5	4,0	4,0	0,1%
Palestina	14,0	8,0	16,0	13,5	13,5	13,5	13,5	0,4%
Rusia	15,0	22,0	21,0	24,0	27,0	27,0	26,5	0,8%
Suiza	6,0	13,0	13,0	13,5	13,5	13,5	13,5	0,4%
Taiwan	3,0	4,0	5,0	5,0	6,0	6,0	6,0	0,2%
Otros	13,0	13,0	13,0	13,0	13,0	11,5	11,5	1,9%
Total producción aceite de oliva mundial (1000 toneladas)								100%

Tabla 3 Consumo de aceite de oliva a nivel mundial (1000 toneladas). Fuente: COI (2015)

	2008/9	2009/0	2010/1	2011/2	2012/3	2013/4	revisión 2014/5	%
Chipre	4,1	5,0	6,5	6,3	6,0	6,3	6,5	0,3%
España	533,6	539,4	554,2	574,0	486,9	530,4	515,0	30,1%
Francia	113,5	114,8	112,8	112,0	113,1	94,7	99,5	6,2%
Grecia	229,0	228,5	227,5	200,0	180,0	171,0	160,0	11,6%
Italia	710,0	675,7	660,0	610,0	550,0	620,0	520,0	35,8%
Portugal	87,5	87,8	82,0	78,0	74,0	74,0	74,0	4,5%
Eslovenia	1,8	2,0	2,1	1,9	1,9	1,9	2,0	0,1%
Alemania	47,7	50,1	58,8	61,0	60,5	59,8	58,7	3,2%
Austria	8,9	8,9	8,7	9,2	8,0	8,1	8,1	0,5%
Bélgica	11,5	12,3	13,7	13,4	13,8	13,9	13,8	0,7%
Bulgaria	1,0	1,3	1,3	1,9	2,0	2,0	2,0	0,1%
Dinamarca	4,5	4,3	5,9	4,8	5,8	5,8	5,8	0,3%
Estonia	0,1	0,3	0,4	0,6	0,5	0,5	0,5	0,0%
Finlandia	1,7	1,7	2,4	2,7	2,9	2,9	2,9	0,1%
Hungría	1,9	2,3	2,5	2,1	2,2	2,1	2,1	0,1%
Irlanda	8,0	5,7	6,3	4,8	5,8	5,5	5,5	0,3%

	2008/9	2009/0	2010/1	2011/2	2012/3	2013/4	revisión 2014/5	%
Letonia	1,4	1,2	1,5	1,6	1,5	1,9	1,5	0,1%
Lituania	0,5	0,7	1,0	0,8	1,1	1,0	1,0	0,0%
Luxemburgo	0,9	1,1	1,2	1,4	3,0	2,9	2,9	0,1%
Malta	0,6	0,7	0,6	0,7	0,7	0,6	0,7	0,0%
Países Bajos	11,7	27,2	16,3	14,6	14,4	15,3	15,4	0,9%
Polonia	5,1	3,5	9,6	10,4	7,9	10,4	10,4	0,4%
Rep. Checa	4,8	4,4	6,1	5,0	4,0	4,5	4,4	0,3%
Rumanía	1,5	3,2	5,7	3,7	3,5	3,8	3,8	0,2%
Reino Unido	56,4	55,3	69,5	59,2	62,0	62,2	61,0	3,4%
Eslovaquia	1,1	1,2	1,8	1,8	1,6	0,3	0,3	0,1%
Suiza	7,2	7,4	8,1	8,4	8,3	8,3	6,9	0,4%
Total producción aceite de oliva mundial (1000 toneladas)								100%

Tabla 4 Consumo de aceite de oliva en Europa (1000 toneladas). Fuente: COI (2015)

1.1.3. Clasificación de aceites. Categorías y definiciones

Actualmente las categorías que se establecen en el reglamento de la Comunidad Europea (Reglamento (CE) 1348/2013) son las mismas que se establecen en la norma comercial del COI (COI/T.15/NC nº3/Rev. 7 de mayo de 2013). Las categorías en las que se puede clasificar el aceite de oliva son:

- *Aceite de oliva virgen*: es el obtenido del fruto del olivo únicamente por procedimientos mecánicos u otros procedimientos físicos en condiciones, especialmente térmicas, que no impliquen la alteración del aceite y que no haya tenido más tratamiento que el lavado, la decantación, la centrifugación y el filtrado, con exclusión de los aceites obtenidos por disolventes o por procedimientos de reesterificación y de toda mezcla con aceites de otra

naturaleza. Dentro de los aceites de oliva vírgenes, y según sus características, pueden establecer las siguientes categorías:

- *Aceite de oliva virgen extra*: aceite de oliva virgen de sabor y olor absolutamente irreprochable, cuya valoración organoléptica tenga como mediana de los defectos cero y mediana del atributo frutado mayor que cero. Su acidez libre expresada en ácido oleico debe ser menor o igual a 0,8º (0,8 gramos por 100 gramos de aceite). Debe, naturalmente cumplir el resto de los límites impuestos por el reglamento.
- *Aceite de oliva virgen* (el calificativo de fino puede utilizarse en la fase de producción y del comercio al por mayor). Es el aceite de oliva virgen de buen sabor y olor, con una mediana de defectos mayor de 0 y menor o igual a 2,5 y una mediana del atributo frutado mayor que cero. Su acidez debe ser menor o igual a 2,0º. Este aceite debe cumplir, al igual que el anterior, con el resto de parámetros de la reglamentación. Se trata de un aceite virgen con pequeñas alteraciones, que son prácticamente imperceptibles en el caso de la catalogación sensorial.
- *Aceite de oliva lampante*: aceite de oliva virgen de sabor y olor defectuosos, cuya puntuación organoléptica establece una mediana de defectos mayor de 6 o su acidez es superior a 2,0º. Su nombre hace referencia a su uso, hasta hace pocos años, en la

iluminación de lámparas o lucernarias. Este aceite no puede consumirse sin un proceso de refinación.

- *Aceite de oliva refinado*: aceite de oliva obtenido por refinado de aceites de oliva vírgenes, por métodos que no provoquen alteraciones en la estructura glicéridica original, con una acidez máxima expresada en ácido oleico de 0,3 gramos por 100 gramos.
- *Aceite de oliva*: aceite constituido por una mezcla de aceite de oliva refinado y de aceite de oliva virgen (excepto lampante), con una acidez máxima en términos de ácido oleico de 0,3 gramos por cada 100 gramos.
- *Aceite de orujo de oliva crudo*: aceite obtenido por tratamiento de los orujos de oliva con disolventes, con exclusión de los aceites obtenidos por procedimientos de reesterificación y de toda mezcla con aceites de otra naturaleza.
- *Aceite de orujo de oliva refinado*: aceites destinados a uso comestible obtenidos por el refinado del aceite de orujo de oliva crudo, con una acidez no superior a 0,3 gramos por 100 gramos.
- *Aceite de orujo de oliva*: mezcla de aceite de orujo de oliva refinado y de aceite de oliva virgen (excepto lampante), con una acidez máxima expresada en ácido oleico de 1,0 gramos por 100 gramos.

En España existen treinta y dos Denominaciones de Origen Protegidas (DOPs) de aceite de oliva virgen y extra, cada una de ellas regida por sus propios estatutos, cuidando la calidad de los aceites por ellas producidos y marcando pautas de cultivo, de recogida, de elaboración, de embotellado y de etiquetado. Todas ellas están comprometidas con la calidad final del producto, a través de rigurosos controles de calidad; sobre todo, porque durante mucho tiempo ha habido, en muchos países, sonados casos de corrupción y adulteración del aceite de oliva. En la Figura 1, se muestra un mapa geográfico con la distribución de las distintas DOPs:

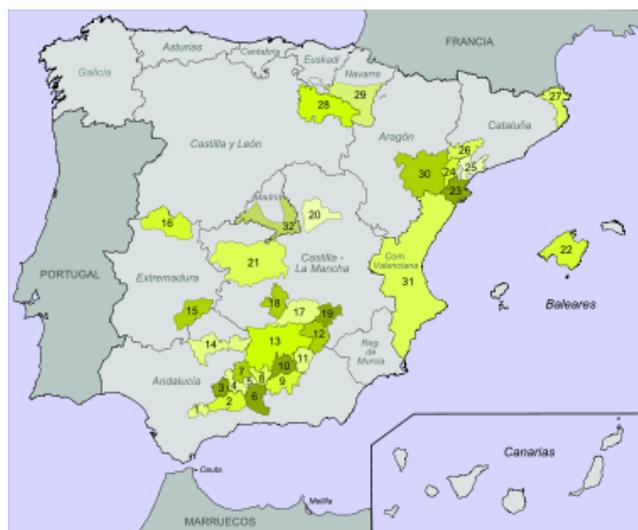


Figura 1 Aceites de oliva virgen con Denominaciones de Origen Protegidas de España.

Fuente: MARM (2009)

Andalucía: (1) Sierra de Cádiz; (2) Antequera; (3) Estepa; (4) Lucena; (5) Priego de Córdoba; (6) Poniente de Granada; (7) Baena; (8) Jaén Sierra Sur; (9) Montes de Granada; (10) Sierra Mágina; (11) Sierra de Cazorra; (12) Sierra de Segura; (13) Campiñas de Jaén; (14) Montoro-Adamuz. Extremadura: (15) Monterrubio; (16) Gata-Hurdes. Castilla La Mancha: (17) Aceite Campo de Montiel; (18) Campo de Calatravas; (19) Aceite Montes de Alcaraz; (20) La Alcarria; (21) Montes de Toledo. Baleares: (22) Aceite de Mallorca. Cataluña: (23) Baix Ebre-Montsià; (24) Oli de Terra Alta; (25) Siurana; (26) Les Garrigues; (27) Oli de l'Empordà. La Rioja: (28) Aceite de La Rioja. Navarra: (29) Aceite de Navarra. Aragón: (30) Aceite del bajo Aragón. Comunidad Valenciana: (31) Aceite de la Comunitat Valenciana. Madrid: (32) Aceite de Madrid.

1.1.4. Composición del aceite de oliva

El aceite de oliva, como todos los aceites vegetales, está constituido fundamentalmente por dos fracciones, la fracción saponificable y la insaponificable (Luchetti, 2003).

La fracción saponificable representa entre el 98 y 99% del peso total del aceite y está constituida por una mezcla de triglicéridos (ésteres naturales de ácidos grasos y glicerina), ácidos grasos libres, ceras, mono y diglicéridos, ésteres de esteroides y de alcoholes terpénicos y fosfolípidos.

La fracción insaponificable (0,5 a 1,5%) comprende otras muchas sustancias de diferente naturaleza y estructura química tales como: hidrocarburos, terpenos, esteroides, alcoholes, pigmentos, tocoferoles, polifenoles y compuestos volátiles. Esta fracción constituye la “huella digital” del aceite y se ha utilizado para la autenticación de aceites de oliva, caracterización de aceites de oliva vírgenes monovarietales e identificación de su origen geográfico.

- 1) Fracción saponificable:
 - Ácidos grasos: la composición en ácidos grasos del aceite de oliva depende de diversos factores tales como: latitud, clima, variedad, época de recolección, grado de madurez de la aceituna, etc. Estos ácidos grasos se encuentran principalmente formando ésteres con el glicerol, dando lugar a glicéridos (mono-, di- y triglicéridos) y fosfolípidos. También se encuentran en el aceite formando ésteres

con alcoholes de estructura lineal (ceras) o de estructura terpénica.

La proporción de ácidos grasos libres en el aceite es muy pequeña y depende de la calidad de éste ya que la presencia de estos compuestos se debe a un proceso de hidrólisis de los triglicéridos, asociado habitualmente a procesos de deterioro. En el aceite de oliva los que se encuentran en mayor proporción (como glicéridos) son el ácido oleico (18:1), linoleico (18:2), palmítico (16:0), palmitoleico (16:1) y esteárico (18:0), siendo el ácido oleico el que se encuentra en concentraciones más elevadas. Según la Norma Comercial aplicable al Aceite de Oliva, la composición acídica estandarizada es la que se muestra en la Tabla 5. Los amplios rangos de concentraciones que se observan para algunos ácidos grasos se deben a factores genéticos y a las condiciones medioambientales que prevalecen durante el desarrollo del fruto.

Ácido	Contenido (%)
Ácido mirístico (C14:0)	≤ 0,05
Ácido palmítico (C16:0)	7,5 – 20,0
Ácido palmitoleico (C16:1)	0,3 – 3,5
Ácido heptadecanoico (C17:1)	≤ 0,3
Ácido heptadecenoico (C17:1)	≤ 0,3
Ácido esteárico (C18:0)	0,5 – 5,0
Ácido oleico (C18:1)	55,0 – 83,0
Ácido linoleico (C18:2)	3,5 – 21,0
Ácido linolénico (C18:3)	≤ 1,0
Ácido araquidónico (C20:0)	≤ 0,6
Ácido gadoleico (eicosenoico) (C20:1)	≤ 0,4
Ácido behénico (C22:0)	≤ 0,2
Ácido lignocérico (C24:0)	≤ 0,2

Tabla 5 Distribución de ácidos grasos en el aceite de oliva. Fuente: COI (2015)

- Triglicéridos: son los componentes mayoritarios de la fracción saponificable. Son ésteres provenientes de la unión del trialcohol glicerina (1,2,3-propanotriol) con ácidos grasos, ya sean los tres iguales, dos iguales y uno diferente o los 3 diferentes (mismo número de átomos de carbono o no). De todos los triglicéridos que se podrían formar a partir de los ácidos grasos, tan sólo algunos de ellos se encuentran en el aceite de oliva. Los triglicéridos totalmente saturados tales como PPP, SSS, PSP, SPS, etc., nunca se encuentran en el aceite de oliva. Los triglicéridos mayoritarios en el aceite de oliva son el OOO (43,5%), POO (18,4%), OOL (6,8%), POL (5,9%), SOO (5,1%) (P, ácido palmítico; O, ácido oleico; S, ácido esteárico; L, ácido linoleico). El aceite de oliva, como otros aceites vegetales, muestra una baja concentración de ácidos grasos saturados en la posición 2 de la glicerina.
- Mono- y Di-glicéridos: el aceite de oliva, como ya hemos visto, aparte de contener mayoritariamente triglicéridos, también contiene glicéridos parciales. La presencia de mono- y di-acilglicéridos es debida, en parte, a una incompleta biosíntesis, pero principalmente a la hidrólisis del aceite: pueden ser 1,2-diglicéridos provenientes de la síntesis incompleta de los triglicéridos, y 1,3-diglicéridos provenientes de la hidrólisis de los triglicéridos. En el aceite de oliva virgen, las concentraciones de diglicéridos

varían entre 1 y 2,8%. Los monoglicéridos están presentes en cantidades mucho menores (menos del 0,25%). La proporción de 1,2-diglicéridos/1,3-diglicéridos se utiliza para conocer las condiciones de almacenamiento y la edad de ciertos aceites.

- **Ceras:** son ésteres de ácidos grasos y alcoholes grasos. Las principales ceras que se encuentran en el aceite de oliva son de número de carbono par, es decir, ésteres C36 a C46. De estos ésteres, los C36 y C38 son los que se encuentran en mayor concentración en el aceite de oliva virgen, mientras que en el aceite de orujo de oliva y en el aceite refinado los ésteres mayoritarios son los C40, C42, C44 y C46.

Los valores máximos de estos compuestos en el aceite de oliva están establecidos por las normas de la Comunidad Europea (CE, 2013) según la categoría del aceite (Tabla 6):

	Valor máximo
Aceite de oliva virgen (no lampante)	≤ 150
Aceite de oliva y aceite de oliva refinado	≤ 350
Aceite de orujo de oliva	> 350

Tabla 6 Valores máximos de ceras según categoría del aceite (mg/kg).
Fuente COI (2015)

Varios autores han demostrado que se producen cambios en la concentración de ceras de los aceites de

oliva de forma natural. Así se ha visto que tiene lugar un incremento en el contenido de ceras durante el almacenamiento del aceite de oliva virgen.

El contenido en ceras junto con el de uvaol y eritrodiol permite detectar la adulteración del aceite de oliva con aceite de orujo de oliva.

- Fosfolípidos: los principales fosfolípidos encontrados en el aceite de oliva son: fosfatidilcolina, fosfatidiletalona, fosfatidilinositol y fosfatidilserina. El ácido oleico es el ácido graso predominante en la estructura de los fosfolípidos, y el patrón de ácidos grasos es similar al de los triglicéridos. El aceite de oliva virgen recién producido puede contener cantidades pequeñas de fosfolípidos, entre 40 y 135 mg/kg.

2) Fracción insaponificable:

El aceite de oliva contiene pequeñas cantidades (normalmente menos del 1%) de compuestos que no son glicéridos de ácidos grasos. Estos constituyentes menores del aceite permiten caracterizar las distintas variedades oleícolas, determinar el sistema de extracción utilizado, conocer su calidad sensorial y autenticarlo frente a otros aceites comestibles. Juegan, además, un importante papel en la estabilidad, sabor y aroma del aceite. Entre estos constituyentes nos encontramos:

- Hidrocarburos: en el aceite de oliva existen pequeñas cantidades de hidrocarburos saturados lineales (C15-

C35), ramificados, terpénicos e incluso aromáticos, pero el principal hidrocarburo del aceite de oliva es el escualeno (C₃₀H₅₀); polímero triterpénico lineal de isopreno. Este compuesto, precursor bioquímico de esteroides, se encuentra en el aceite de oliva en una concentración (2500-9250 µg/g) muy superior a la de la mayoría de los aceites vegetales (16-370 µg/g) y es el principal constituyente de la fracción insaponificable del aceite de oliva.

- Esteroides: están relacionados con la calidad del aceite de oliva, y se utilizan para comprobar su autenticidad. El contenido total de esteroides en el aceite de oliva es del orden de 80-260 mg/100g, siendo los que se encuentran en mayor proporción el β-sitosterol, Δ⁵-avenasterol y campesterol. En pequeñas cantidades se encuentran: estigmasterol, campestanol, colesterol, 24-metilencolesterol, Δ⁷-campesterol, Δ^{5,23}-estigmastadienol, clerosterol, sitostanol, Δ^{5,24}-estigmastadienol, Δ⁷-estigmatenol, Δ⁷-avenasterol y Δ⁷-estigmasterol. El β-sitosterol representa el 75-90% de la fracción total de esteroides y contribuye a disminuir la absorción intestinal del colesterol. En la siguiente tabla (Tabla 7), se muestran los límites establecidos por el COI para cada uno de los esteroides. Estos compuestos son útiles en la detección de adulteraciones de aceite de oliva con aceites de semillas, así como en la caracterización de aceites varietales y determinación de su origen geográfico.

Esterol	Límites*
Colesterol	≤ 0,5%
Brasicasterol	≤ 0,1% ^a
Campesterol	≤ 4,0%
Estigmasterol	< campesterol para los aceites comestibles
Δ^7 -estigmatenol	≤ 0,5%
B-sitosterol aparente	≥ 93,0% ^b

* como porcentaje del total de esteroides

^a < 0,2% para aceites de orujo de oliva

^b El sitosterol aparente engloba β -sitosterol, Δ^5 -avenasterol, $\Delta^{5,23}$ -estigmastadienol, clerosterol, sitostanol, $\Delta^{5,24}$ -estigmastadienol

Tabla 7 Límites para los esteroides (COI, 2015)

- **Tocoferoles:** contribuyen de manera importante a la estabilidad del aceite de oliva, y desempeñan un papel biológico beneficioso como antioxidantes. El contenido en tocoferol de un aceite, al igual que otros compuestos, depende mucho de la variedad de aceituna. Sus concentraciones varían desde 5 a 300 mg/kg aunque en los aceites de buena calidad, el contenido suele estar entre 100 y 300 mg/kg. La forma α -tocoferol representa el 90-95% del total de los tocoferoles, las formas β y γ se encuentran por debajo del 10% y la δ en una proporción muy baja. De éstos, el más activo biológicamente es el α -tocoferol por su acción como vitamina E, con lo que representa una valiosa fuente nutritiva. Su contenido es

muy variable, oscilando normalmente entre 125-200 mg/kg, y depende del origen de la aceituna, la variedad, el estado de maduración y el tipo de conservación.

Son compuestos muy inestables frente a los tratamientos térmicos y prácticamente desaparecen durante el proceso de desodorización aplicado en la refinación. Esto hace que los aceites refinados presenten menor protección frente a la oxidación que los aceites de oliva vírgenes. El contenido en tocoferoles del aceite de oliva puede emplearse para detectar adulteraciones con aceites de semillas.

- Alcoholes alifáticos: estos alcoholes pueden ser lineales o terpénicos. Los principales alcoholes lineales presentes en el aceite de oliva son de número par de átomos de carbono. Esta característica permite detectar su adulteración con otros aceites de semilla que por el contrario poseen alcoholes lineales de cadenas de número de átomos de carbono impar. El perfil de estos compuestos permite, además, determinar el método de extracción del aceite (presión o centrifugación).

Los alcoholes lineales más representativos del aceite de oliva son el tetracosanol, hexacosanol y octacosanol. El tricosenol, pentacosanol y heptacosanol pueden estar presentes a nivel de trazas.

- Alcoholes triterpénicos: se encuentran en una concentración de 100-300 mg/100g de aceite y generalmente son de estructura tetracíclica o

pentacíclica. Los más importantes en el aceite de oliva son el taraxerol, dammaradienol, β -amirina, butirospermol, 24-metilen-24-dihidro-lanesterol, cicloartenol y 24-metilen-cicloartenol, siendo este último el que se encuentra en mayor concentración. Los alcoholes triterpénicos son marcadores de ciertos aceites monovarietales por lo que se pueden usar para su identificación.

- Dioles triterpénicos: son particularmente importantes desde un punto de vista biológico. En el aceite de oliva se han identificado dos dihidroxitriterpenos: eritrodiol y uvaol. La cuantificación de estos dos alcoholes nos permite distinguir entre aceite de oliva y aceite de orujo ya que sus concentraciones son mucho más elevadas en aceites obtenidos mediante extracción que en los obtenidos mediante presión del fruto.
- Compuestos fenólicos (fenoles, ácidos fenólicos, polifenoles): estos compuestos influyen en la calidad del aceite, especialmente en su estabilidad frente a la oxidación, así como en sus propiedades organolépticas. De todos los aceites vegetales, únicamente el aceite de oliva virgen contiene compuestos fenólicos naturales. Estos compuestos se encuentran en el mesocarpio de las aceitunas y durante el proceso de extracción, aunque son fundamentalmente solubles en agua, una pequeña parte de ellos pasan al aceite. Los principales polifenoles del aceite de oliva son el tirosol e hidroxitirosol, derivados de

la hidrólisis de la oleuropeína (glucósido fenólico de la aceituna que produce sabor amargo). La acción estabilizadora de estas sustancias, en especial del tirosol e hidroxitirosol se debe a que actúan como inhibidores naturales de la oxidación. Otros compuestos fenólicos presentes en el aceite de oliva son la oleuropeína, el ácido cafeico, ácido vanílico, ácido sirínico, ácido p-cumárico, ácido o-cumárico, ácido protocatéuico, ácido sinápico, ácido p-hidroxibenzoico, ácido p-hidroxifenilacético y ácido homovanílico. Los ácidos cinámico, elenólico y siquémico también se incluyen como fenoles del aceite de oliva. El contenido de los polifenoles de los aceites de oliva varía con el sistema de cultivo, la variedad y el estado de maduración de la aceituna, los factores ambientales, las condiciones de almacenamiento y las técnicas de elaboración industrial (50-800 mg/kg expresado como ácido cafeico).

- Pigmentos: en el aceite de oliva existen dos clases de pigmentos naturales, las clorofilas y los carotenos. La fracción clorofílica la componen las clorofilas a y b y sus correspondientes productos de descomposición, feofitinas a y b. El contenido de clorofilas en aceites de oliva vírgenes varía de 0,1 a 1,0 mg/100g de aceite y depende de la variedad, del grado de madurez de la aceituna y del sistema empleado para la extracción del aceite. En esta fracción predomina la feofitina a (20-40%) y la clorofila a (4-7%). Estos pigmentos son responsables

de la tonalidad verde del aceite de oliva y desempeñan un importante papel en su conservación ya que actúan como prooxidantes en presencia de luz y como antioxidantes en la oscuridad, en sinergia con los compuestos fenólicos.

- Los carotenos, por el contrario, son responsables de la tonalidad amarilla de los aceites. Los principales carotenoides presentes en el aceite de oliva son: luteína, β -caroteno y varios xantenos (euroxanteno, luteoxanteno, violaxanteno y neoxanteno). El β -caroteno, hidrocarburo terpénico, está dotado de acción provitamina A. El contenido total de carotenos varía entre 0,5-1 mg/100g de aceite y depende de la variedad, sistema de extracción y grado de madurez de las aceitunas empleadas. Estos pigmentos, al igual que las clorofilas, van disminuyendo su concentración en las aceitunas a medida que avanza la maduración. El carotenoide que tarda más tiempo en degradarse es la luteína y el que se degrada más rápido el β -caroteno.
- Compuestos volátiles: estos compuestos diferencian al aceite de oliva virgen del resto de los aceites vegetales, ya que desaparecen durante el proceso de refinación. En el aroma del aceite de oliva se han identificado más de 100 compuestos volátiles, dentro de este grupo pueden encontrarse: hidrocarburos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, ácidos, compuestos fenólicos, compuestos terpénicos y derivados del furano. Algunos

de ellos tienen una gran contribución al sabor del aceite de oliva virgen, otros, por el contrario, no presentan propiedades sensoriales y otros, a las concentraciones que se encuentran en el aceite de oliva, tienen una contribución muy pequeña al sabor. El número y tipo de compuestos volátiles presentes en un aceite de oliva, está directamente relacionado con su calidad sensorial.

En la siguiente tabla (Tabla 8), se muestra un resumen de los compuestos que forman parte de la fracción insaponificable del aceite de oliva y sus actividades:

Compuestos	Cantidad o proporción	Funciones
Terpenos: Escualeno	2500-9250 µg/g	Intermediario en la síntesis de esteroides
Pigmentos: Clorofilas Carotenos	1-10 mg/kg 5-10mg/kg	Coloración Coloración
Tocoferoles: α-tocoferol β y γ-tocoferol δ-tocoferol	5-300 mg/kg 90-95% del total ≤ 10% muy baja	Antioxidantes Vitamina E
Esteroides: Campesterol Estigmasterol β-sitosterol	80-260 mg/100g ≤ 4% < campesterol 75-90%	Actividad hipocolesterolemizante
Compuestos fenólicos	50-800 mg/kg (expresado como ácido cafeico)	Antioxidantes Propiedades organolépticas
Compuestos volátiles	Alcoholes, cetonas, ésteres, aldehídos, etc.	Flavor
Compuestos fenólicos	50-800 mg/kg (expresado como ácido cafeico)	Antioxidantes Propiedades organolépticas

Compuestos volátiles	Alcoholes, cetonas, ésteres, aldehídos, etc.	Flavor
----------------------	---	--------

Tabla 8 Compuestos de la fracción insaponificable del aceite de oliva (COI, 2015)

1.1.5. Parámetros de calidad

La calidad de un producto alimentario es el conjunto de cualidades que hacen aceptables los alimentos a los consumidores. Estas cualidades incluyen tanto las percibidas por los sentidos (cualidades sensoriales): sabor, olor, color, textura, forma y apariencia, tanto como las higiénicas y químicas. La calidad de un alimento puede ser diferente según su utilización final.

En el caso del aceite de oliva, no existe una calidad única, sino distintas y contempladas bajo diferentes ópticas, como son la comercial, nutricional, sanitaria y la relacionada con su valor culinario (fritura, aderezo de ensaladas, etc.). Estas cualidades se pueden evaluar mediante diversos parámetros instrumentales o sensoriales, que son específicos para cada tipo de utilización. Tanto la Comunidad Europea como el COI, elaboraron en 2013, reglamentos que regulan las denominaciones de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva. En ambos reglamentos existen unos parámetros que evalúan la calidad de los aceites (parámetros de calidad) y son: acidez libre, índice de peróxidos, K_{270} , K_{232} , ΔK y características organolépticas. En la Tabla 9 se recogen los límites establecidos por la CE para cada uno de los parámetros anteriores según la categoría del aceite.

CATEGORÍA	Acidez %	Índice de peróxidos meq/O ₂ /kg	Colesterol %	K ₂₃₂	K ₂₇₀
Aceite de oliva virgen extra	≤ 0,8	≤ 20	≤ 0,5	≤ 2,50	≤ 0,22
Aceite de oliva virgen	≤ 2,0	≤ 20	≤ 0,5	≤ 2,60	≤ 0,25
Aceite de oliva virgen lampante	> 2,0	--	≤ 0,5	--	--
Aceite de oliva refinado	≤ 0,3	≤ 5	≤ 0,5	--	≤ 1,1
Aceite de oliva	≤ 1,0	≤ 15	≤ 0,5	--	≤ 0,90
Aceite de orujo de oliva crudo	--	--	≤ 0,5	--	--
Aceite de orujo de oliva refinado	≤ 0,3	≤ 5	≤ 0,5	--	≤ 2,0
Aceite de orujo de oliva	≤ 1,0	≤ 15	≤ 0,5	--	≤ 1,70

Tabla 9 Límites establecidos por la Unión Europea para clasificar un aceite (COI, 2015)

El grado de acidez, mide el porcentaje de ácidos grasos libres, expresado en ácido oleico, presente en un aceite. Es un índice de alteración sufrida por el fruto y de las fermentaciones que han podido tener lugar durante el proceso de elaboración y conservación.

El índice de peróxidos evalúa el estado de oxidación primaria del aceite. Las causas más importantes de un alto valor de este índice son la procedencia del fruto (suelo, heladas) y la exposición durante la elaboración y el almacenamiento del aceite a factores que provocan la oxidación (altas temperaturas, aireación y presencia de trazas metálicas).

El K₂₃₂, es una medida espectrofotométrica realizada a una longitud de onda de 232 nm, y se utiliza, junto con el índice de peróxidos, como medida de la oxidación primaria del aceite. A esta longitud de onda absorben los dienos conjugados.

Los trienos conjugados absorben a 270 nm por lo que K₂₇₀ indica el estado de oxidación secundaria del aceite. Los dienos y trienos conjugados, formados durante la refinación o blanqueado del

aceite de oliva también absorben a 270 nm, por lo que la alta absorbancia a 270 nm está relacionada con la oxidación del aceite de oliva, con el proceso de refinación o con ambas cosas a la vez.

Los productos resultantes de la oxidación secundaria del aceite (aldehídos y cetonas) absorben también a longitudes de onda de 262, 268 y 274 nm. El coeficiente ΔK tiene en cuenta las absorbancias a estas longitudes de onda, estando por tanto relacionado con la oxidación secundaria del aceite y se define como:

$$\Delta K = K_{268} - [(K_{262} + K_{274})/2]$$

Valores bajos de absorbancia (K_{232} , K_{270} y ΔK) corresponden a aceites de oliva de buena calidad.

Además de por sus parámetros físico-químicos, los aceites vírgenes de oliva se clasifican por sus características organolépticas, determinadas por un grupo de catadores de acuerdo con las normas del análisis sensorial.

1.1.6. Aspectos nutricionales

Para comprender el importante papel que el aceite de oliva tiene en la nutrición humana es necesario analizar las fundamentales y variadas funciones desempeñadas por el grupo de las grasas en la alimentación y en el organismo (Morales, 2006).

Las grasas comestibles que se consumen en la dieta poseen principalmente una función energética, siendo la fuente que proporciona el mayor aporte energético, 9,3 kcal/g frente a los 4,1 kcal/g de los hidratos de carbono y de las proteínas. También representan el combustible fundamental para la obtención de

energía química y de calor en el organismo y constituyen la forma de reserva energética más importante.

Otra función de este grupo de alimentos es suministrar los ácidos grasos esenciales (ácidos linoleico (omega 6) y alfa-linolénico (omega 3)), compuestos que el organismo humano no puede sintetizar y que por lo tanto tienen que ser obtenidos a través de la dieta, además de aportar las vitaminas liposolubles, que se encuentran asociadas a los lípidos y que dependen de éstos para ser ingeridos y absorbidos.

Las grasas también participan en la estructura de las membranas biológicas y de las lipoproteínas plasmáticas, a las que confieren importantes características funcionales y además son precursores de moléculas fundamentales con actividad biológica.

Junto a estas propiedades de gran interés bioquímico las grasas proporcionan a los alimentos importantes propiedades como la palatabilidad y producen una elevada sensación de saciedad por permanecer un elevado tiempo en el estómago. Además constituyen un beneficioso aislamiento térmico para el cuerpo y protegen a los órganos y nervios contra choques y lesiones traumáticas.

Cabe destacar que el aceite de oliva, es el único aceite vegetal que se puede consumir directamente virgen y crudo. Dentro de los aceites comestibles es, sin duda, el que más vitamina E aporta, con el consecuente efecto antioxidante, que lo hace tan recomendable.

Además, su contenido en vitaminas liposolubles A, D y K, completa su valor vitamínico.

Estos son algunos de los beneficios que aporta al organismo (Owen R.W., 2004; Pérez Jiménez F., 2006; Cicerale S., 2009; Martín-Peláez S., 2013):

- Aparato circulatorio: ayuda a prevenir la arteriosclerosis y sus consecuencias (Pérez-Jiménez F., 2007; Covas M.I., 2009).
- Aparato digestivo: mejora el funcionamiento del estómago y el páncreas, a nivel hepatobiliar y a nivel intestinal (Nidhi B., 2014).
- Piel: efecto protector y tónico de la epidermis (Danby S.G., 2013; Kiechl-Kohlendorfer U., 2008).
- Sistema endocrino: mejora las funciones metabólicas (Pérez-Martínez P., 2011).
- Sistema óseo: estimula el crecimiento y favorece la absorción del calcio y la mineralización (Fernández-Real J.M, 2012).

En la alimentación infantil, el uso exclusivo del aceite de oliva en las comidas (en ensaladas, guisos y fritos), se asocia con una menor ganancia de peso durante la infancia, además de relacionarse con una celularidad del tejido adiposo más favorable para el futuro del individuo (Haro-Mora y col., 2011).

La dieta mediterránea -declarada Patrimonio Inmaterial de la Humanidad por la UNESCO en 2010 y muy nombrada últimamente por sus múltiples propiedades- tiene su base en el aceite de oliva.

En España, la ingesta de grasa total, aunque elevada, está en línea con otros países desarrollados (54,9g/persona-día). Dentro de los aceites comestibles, predomina el aceite de oliva (32,9g/persona-día) que representa un 60% del total de la grasa consumida. Desde el punto de vista de las enfermedades cardiovasculares, la calidad de la ingesta grasa de los españoles es excelente. La razón está en la alta proporción de ácidos grasos monoinsaturados ingeridos (>50% del total de ácidos grasos), en gran parte suministrados por el aceite de oliva. El perfil lipídico se encuentra dentro de los límites recomendados, aunque hay que tener presente que éste se juzga desde el contexto de una dieta alta en grasa. La elevada ingesta de ácidos grasos monoinsaturados (MUFAs) frente al nivel moderado de los ácidos grasos saturados y poliinsaturados (PUFAs) es parte fundamental en la calidad de la dieta mediterránea. La mayor parte de la ingesta de esta grasa procede de la grasa culinaria, lo que es beneficioso, ya que ofrece muchas posibilidades de manipulación de la ingesta lipídica.

1.1.7. El aceite de oliva según la variedad de la aceituna

Existe una gran variedad de aceitunas. Sólo en España se han contabilizado doscientas sesenta y dos variedades. Así pues, se han dividido en cuatro categorías según su importancia y difusión (www.magrama.gob.es). Las principales son veinticuatro y son las que

ocupan una mayor extensión o son dominantes, al menos, en una comarca. De las veinticuatro, destacan las siguientes: picual, cornicabra, hojiblanca, lechín de Sevilla, morisca, empeltre, arbequina y blanqueta. Las secundarias (también veinticuatro), no llegan a dominar ninguna comarca, pero regularmente sirven de base para plantaciones. Por otro lado están las variedades difundidas, que son 50, y por último, las locales, que aparecen en árboles individuales que se encuentran esporádicamente en la zona de una o varias comarcas.

Cada variedad de aceituna se caracteriza por diferentes matices en el sabor de su aceite y por el diferente nivel de productividad que ofrece.

- **Picual:** otros nombres son marteño, lopereña y nevadiño. Es originaria de Martos (Jaén). Es muy cultivada en la provincia de Jaén, aunque también es frecuente en las de Córdoba y Granada. Es muy apreciada por su precoz entrada en producción, su alta productividad, por tener un gran contenido graso, así como su alto índice de estabilidad y su contenido de ácido oleico. Representa más del 50% de la producción española, y un 20% de la mundial. Da un excepcional aceite de tonos verdes, con predominio de los sabores ligeramente amargos y afrutados y es muy resistente a las heladas. Es la variedad menos vecera, es decir la que mantiene una media de producción constante a lo largo de su vida productiva.
- **Hojiblanca:** también llamada casta de Lucena y lucentino. Principalmente cultivada en las provincias de Sevilla,

Córdoba y Málaga. Se extrae de ella un aceite de gran calidad aunque el rendimiento de sus frutos es bajo. Produce generalmente aceites de tonos dorados y de sabor suave.

- **Lechín de Sevilla:** otros nombres son ecijano y zorzaleño. Se localiza en las provincias de Sevilla, Badajoz, Cádiz, Huelva y Málaga. Su contenido de aceite es medio, pero de calidad.
- **Morisca:** se localiza básicamente en Badajoz. También llamada basta, macho y verdial. Se trata de una variedad muy resistente a la sequía. Tiene la particularidad de emplearse tanto para la obtención de aceite, por su alto rendimiento graso, como de oliva de mesa.
- **Arbequina:** debe su nombre al municipio de Arbeca (Cataluña), aunque también es llamada blanca. Es mayoritaria en la provincia de Lérida, especialmente en la comarca de Les Garrigues, es también habitual en la provincia de Tarragona (Camp de Tarragona, Baix Camp, comarcas de Siurana y de Riudecañes). Con esta variedad se elaboran los aceites con denominación de origen *Garrigues* y *Siurana*. Fue plantada por las tropas del rey Jaime I en su vuelta tras la conquista de Baleares. Se ha extendido su cultivo a provincias andaluzas y castellano-manchegas por su precoz entrada en producción, elevada productividad, buen rendimiento graso y excelente calidad, aunque su rendimiento es bajo. Esta oliva da lugar a aceites

muy aromáticos, de color verde a principio de cosecha, y almendrados, nada de amargos ni picantes con notas olfativas características.

- **Empeltre:** habitualmente cultivada en las provincias de Zaragoza, Teruel y Baleares. Es apreciada por su productividad y la excelente calidad de su aceite. Da lugar a aceites amarillos y dulces, con un aroma característico que recuerda al plátano y la manzana.
- **Cornicabra:** otros nombres son cornacha, cornizuelo, corniche y ornal. Es típica de las zonas de Ciudad Real y Toledo, es una variedad habitual en todo el oeste de castilla-La Mancha y sus zonas limítrofes con Extremadura. También puede encontrarse en Madrid. Proporciona aceites de sabor fuerte y muy aromáticos. Es apreciada por su gran rendimiento graso, por la calidad de su aceite y por su gran estabilidad.
- **Blanqueta:** de buena calidad, es típica de las provincias de Valencia y Alicante. Desde los años 90 se ha venido usando mucho en el Levante español.
- **Royal:** de la comarca de Cazorla (Jaén). De color rojo, su principal característica organoléptica es que el aceite que ofrece es de frutado fresco y dulce aroma. Su sabor es suave y nada agresivo al paladar. En nariz presenta un frutado maduro intenso con matices de higo maduro. Es un aceite de altísima calidad. Además, esta variedad es la única 'Royal' del mundo con Denominación de Origen.

- **Serrana:** es una variedad del Alto Palancia, en las estribaciones de la Sierra de Espadán, en el interior de la provincia de Castellón. Da uno de los mejores aceites extra vírgenes españoles actualmente premiados en certámenes internacionales, y nacionales, su color es dorado verdoso, con un gran cuerpo, y sabor muy afrutado.

Otras variedades españolas son: picudo (también conocida como carrasqueña o pajarera), verdial de Vélez-Málaga, verdial de Badajoz, verdial de Huévar, manzanilla sevillana, manzanilla cacereña, sevillena, morrut, changlot real, etc.

1.2. LA TÉCNICA DE FRITURA EN BAÑO DE ACEITE

Aunque esta técnica de cocinado se conoce desde hace unos 5000 años, no es hasta el siglo XIX cuando se desarrolla y aplica tal y como la practicamos hoy en día.

Hasta hace algunos años, la fritura de los alimentos en baño de aceite (“deep frying”) era una técnica de muy poco prestigio y poco popular fuera de los países mediterráneos; atendiendo a cuestiones de digestibilidad y toxicidad (Varela y Ruiz-Roso, 2003). Hoy en día esta situación ha cambiado y la fritura, en los países desarrollados, se ha convertido en una de las técnicas culinarias en mayor expansión, tanto a nivel doméstico como industrial.

La fritura es un proceso físico-químico complejo, en el cual, el producto a freír (patatas, carne, pescado, productos empanados, etc.) se introduce crudo o cocido en el aceite durante un determinado

tiempo, a temperaturas entre 175-195°C, para favorecer una rápida coagulación de las proteínas de la superficie del producto y provocar una casi impermeabilización del mismo. El agua que contiene el alimento, se va convirtiendo en vapor. En esta fase, la temperatura en el interior del alimento no debe estar por encima de los cien grados centígrados, ya que la evaporación del agua debe ser continua durante todo el proceso.

Esta situación facilita la cocción interna del producto, el cual queda más jugoso y permite la conservación de muchas de las características propias del alimento, mejorando en la mayoría de los casos, su sabor, textura, aspecto y color. En definitiva, se consigue un producto más apetecible.

El producto frito posee una estructura distintiva. Si el proceso se ha llevado a cabo correctamente, se forma una costra periférica crujiente de un color entre dorado y pardo. Esta costra es resultado de las reacciones de las proteínas y los azúcares por acción del calor, del pardeamiento no enzimático (Reacción de Maillard) y de los azúcares al sufrir la caramelización. Esta capa superficial no sólo contribuye al impacto visual del producto, haciéndolo más agradable o atractivo, sino que también impide la penetración de grandes cantidades de grasa al interior del alimento. El grado de oscurecimiento del alimento frito depende de: el tiempo empleado en la fritura, de la temperatura y de la composición química del producto y no tanto de la composición del aceite utilizado en la fritura.

El calor, reduce el contenido de humedad de la capa superficial hasta un tres por ciento o menos y la humedad desprendida es la causante del vapor generado durante el proceso.

El espacio libre que deja el agua que escapa es ocupado por el aceite. La cantidad de aceite absorbido por un alimento depende en gran medida de su contenido en humedad, porosidad y superficie expuesta al aceite de fritura. Esta cantidad es aproximadamente del veinte al cuarenta por ciento, en base al peso del alimento frito. Freír alimentos a temperaturas demasiado bajas provoca que los mismos atrapen más cantidad de grasa en su interior.

El aceite absorbido le imparte al alimento olor, sabor y color y además favorece la palatabilidad. Por esto, si el aceite tiene sabor u olor extraño, el alimento frito lo tendrá.

El proceso de fritura en baño de aceite depende de múltiples factores, que pueden clasificarse en tres categorías:

- 1) Los que son dependientes de las condiciones del propio proceso (por ejemplo, temperatura y tiempo).
- 2) Los que dependen del tipo de grasa culinaria (por ejemplo, aceite).
- 3) Los que dependen de las características del alimento frito (por ejemplo, carne, pescado...).

De acuerdo con lo anterior, algunas consecuencias prácticas de la técnica culinaria de la fritura en baño de aceite podrían ser las siguientes:

1.- El tiempo de actuación real de la grasa caliente sobre el alimento es realmente muy corto. El tiempo total en el que se desarrolla todo el proceso de fritura es de solamente unos pocos minutos, y la mayor parte del mismo corresponde a la fase de evaporación del agua, en la que la temperatura en el interior se mantiene alrededor de 100°C. El tiempo de actuación real de la grasa caliente sobre el alimento es, por tanto, extraordinariamente corto y limitado sólo a la periferia del alimento. Además, no debemos olvidar que el proceso se desarrolla prácticamente en ausencia de oxígeno. La consecuencia de estos dos factores es que la fritura en baño de aceite es un proceso menos agresivo para los componentes termolábiles del alimento que otros procesos culinarios. Por ejemplo, hay autores que comprobaron que la retención de vitamina C en diferentes alimentos vegetales (patatas y pimientos) fritos es mucho mayor que en los tratados por otros procesos culinarios, como el estofado (Moreiras-Varela y col., 1990).

2.- Si tenemos en cuenta que, como es sabido, la grasa es quizás el componente de los alimentos que más influye en su palatabilidad, el intercambio de agua por grasa y la formación de la costra superficial, incrementa notablemente la palatabilidad de los alimentos fritos, haciéndolos más aceptables.

3.- Por su peculiar cinética de penetración, y si el proceso se realiza correctamente, la cantidad de grasa ingerida con los alimentos fritos no es mayor que cuando se utilizan otros procesos culinarios.

4.- Durante el proceso tienen lugar importantes cambios cuantitativos y cualitativos en la composición grasa del alimento que hace que la ingesta lipídica real con el alimento frito sea muy diferente de la que éste tenía en crudo.

Si atendemos a esta última consecuencia, podemos afirmar que el aceite de oliva es especialmente idóneo para la fritura de los distintos alimentos. La fritura, como se ha indicado, es una técnica que modifica el perfil lipídico del alimento y esto hay que tenerlo en cuenta en el caso de los alimentos magros o grasos, ya que se comportan de diferente manera ante esta forma de cocinado (Ansorena y col., 2010).

En el caso de alimentos magros, se ha estudiado la influencia de la fritura en baño de aceite sobre el contenido en los ácidos grasos de los alimentos de origen vegetal y animal, ya que durante el proceso, la grasa del baño penetra en el alimento y, consecuentemente, este último se enriquece en grasa, con lo que lógicamente la composición de la grasa final del alimento frito será prácticamente la culinaria.

Por otro lado, el problema es mucho más complejo en el caso de los alimentos grasos, ya se trate de carne o pescado. Desde el punto de vista cuantitativo, normalmente la cantidad de grasa que pasa del alimento al baño, o viceversa, es prácticamente la misma, y por ello no hay grandes cambios en la cantidad de grasa total del alimento frito en relación con el crudo. Por el contrario, sí hay cambios desde el punto de vista cualitativo que parecen depender, en gran parte, de los gradientes de concentración de los diferentes ácidos grasos entre la grasa culinaria y el alimento. En este sentido, cuando

se fríen sardinas, tanto en aceite de oliva como de girasol, disminuye la concentración inicial de ácidos grasos saturados (en menor concentración en estos aceites) del pescado frito debido al intercambio de grasa entre el alimento y la grasa culinaria (el aceite de fritura). Si además, las sardinas se fríen en aceite de oliva, se incrementan en éstas notablemente los MUFAs, cuya concentración en el aceite de oliva es mayor que en el pescado. Por el contrario, si se fríe este pescado en aceite de girasol, el incremento se produce en el contenido total de PUFAs y, especialmente, en los ácidos grasos ω -6, debido a que el aceite de girasol es especialmente rico en esta fracción. En ambos casos, con los dos aceites, se produce una disminución de la fracción n-3 PUFA del pescado, si bien esta disminución es de poca consideración en el aceite de oliva y mayor en el girasol (Varela y Ruiz-Roso, 2003).

Por otra parte, se debe tener en cuenta que generalmente los aceites de fritura no se utilizan solamente una vez, sino que el mismo aceite se reutiliza varias veces, para freír nuevas porciones de alimento. Este tema es de gran interés y está muy relacionado con la llamada “vida útil” de las diferentes grasas culinarias. No es fácil determinar esta “vida útil”, ya que va a depender de muchos factores, especialmente de: la composición grasa del alimento y del tipo de aceite utilizado. En este sentido, es bien conocido que el aceite de oliva es mucho más estable que otros aceites ricos en PUFAs debido a su alto contenido en MUFAs.

Por otra parte, el aceite desechado no tiene la misma composición que el crudo ya que está enriquecido en ácidos grasos procedentes de los lípidos del alimento frito. Por ejemplo, si para freír

carne se ha usado aceite de oliva, el aceite desechado contendrá compuestos como los ácidos grasos saturados (SFA), que están relacionados con algunas enfermedades degenerativas. Asimismo, si se usa aceite de oliva en la fritura, la composición en ácidos grasos de algunos alimentos (por ejemplo, carne y huevos), después de la fritura, mejorará sustancialmente debido a los MUFAs del aceite de oliva que penetran en el alimento y son muy beneficiosos para la salud.

1.2.1. Norma de calidad para aceites y grasas calentados

La normativa que se toma como referencia en el presente estudio es la Orden de 26 de Enero de 1989, por la que se aprueba la norma de calidad para los aceites y grasas calentados. Una Orden posterior, del 1 de Febrero de 1991, modificó sólo uno de los artículos.

La fritura es un proceso industrial bastante común en la elaboración de numerosos productos alimenticios y hasta el momento, no había sido contemplada en ninguna de las normativas vigentes, así como tampoco la aptitud para el uso de las materias propias de los baños de fritura una vez utilizadas.

Cabe destacar, por ejemplo, el artículo 6, donde se citan las características que deben reunir los aceites o grasas calentados:

- Estar exentos de sustancias ajenas a la fritura.
- Sus caracteres organolépticos serán tales que no comuniquen al alimento frito olor o sabor impropio.
- El contenido en componentes polares debe ser inferior al 25%, determinado por el método analítico de

cromatografía en columna (descrito en el anexo I de la Orden).

En cuanto a los materiales destinados a estar en contacto con estos aceites y grasas:

- Deben tener una composición adecuada, anticorrosivos y de fácil limpieza.
- No alterarán las características de composición ni los caracteres organolépticos de los baños de fritura.
- No deberán ceder sustancias tóxicas o contaminantes que pudieran modificar la composición normal de los aceites o grasas ni de los alimentos que se fríen.

Las competencias corresponden a las Comunidades Autónomas y a las Corporaciones Locales correspondientes. Su incumplimiento será causa de infracción y se penará con la sanción pertinente.

La mayoría de las ciudades europeas establecen el mismo límite de compuestos polares (25%), a partir del cual se debería desechar el aceite de fritura (Firestone, 1993). No obstante, hay países, como Bélgica o República Checa que marcan, además de este nivel máximo de compuestos polares, un límite de contenido en dímeros de triglicéridos y polímeros (TO) no superior al 10%. En Holanda, se permite hasta un máximo del 16% en TO. Romero y col. (1999) sugieren en su estudio que durante un proceso reiterado de fritura, se alcanza con mayor celeridad este límite del 10% de TO que el del 25% de compuestos polares (CPs); por tanto, sería importante

tener este dato en cuenta de cara a una futura revisión de la normativa.

1.2.2. Efectos tóxicos de los compuestos de alteración del aceite

La Tabla 10 muestra un resumen de las posibles alteraciones más importantes de aceites y grasas, los agentes que las causan y los compuestos principales que se forman mediante cada una de ellas.

AGENTE CAUSANTE	ALTERACIÓN	PRODUCTOS
Humedad	Hidrolítica	Ácidos grasos Diglicéridos Monoglicéridos Glicerol
Oxígeno atmosférico	Oxidativa	Monómeros oxidados Dímeros y polímeros oxidados Dímeros y polímeros Ácidos grasos de cadena corta Compuestos volátiles
Temperatura	Térmica	Isómeros geométricos Monómeros cíclicos Dímeros y polímeros

Tabla 10 Tipos de alteraciones de aceites y grasas

(Fuente: Grasas y aceites alimentarios, 2006)

Se sabe que algunos de estos compuestos son capaces de producir efectos tóxicos (Soni y col., 2001; Márquez-Ruiz y col., 2000). Los monómeros cíclicos en animales de experimentación provocan

retraso en el crecimiento, hipertrofia y/o hiperplasia hepática, e hígado graso. Se ha demostrado que los monómeros cíclicos aislados del aceite de linaza, calentado a 275°C, 12 horas, en atmósfera de nitrógeno, inducen enzimas metabolizantes hepáticas; dicha inducción es del tipo fenobarbital.

Los estudios toxicológicos con dímeros y polímeros son contradictorios entre sí. Algunos autores indican efectos adversos como retraso en el crecimiento, hipotermia, úlceras gástricas y lesiones tisulares en corazón, hígado y riñón. Otros, sin embargo, no describen efecto alguno.

Hay experiencias que demuestran que los aceites de maíz, soja y cacahuete, que han sufrido varios procesos de calentamiento, provocan en animales de experimentación (ratas) una depresión del peso y del consumo de alimentos; un aumento del peso relativo del hígado; diarrea, dermatitis, pérdida de pelo y lesiones histológicas en timo, hígado, médula y piel.

Tras alimentar ratas durante un año con dietas equilibradas en las que el aporte graso estaba constituido por aceite de oliva o de girasol calentados prolongadamente (Sanz y col., 1984), se observó en los animales alteraciones externas (alopecia, piloerección), diarrea, disminución del crecimiento y hepatomegalia, congestión pulmonar y punteado superficial en riñón, así como proteinuria y sedimento urinario. En sangre se encontraron elevados los triglicéridos, ácidos grasos libres y urea sérica, que sugiere una nefropatía, acompañada de afectación hepática por aparecer elevada la fosfatasa alcalina sérica.

Los productos derivados del calentamiento y oxidación de grasas y aceites que presentan mayor interés son los hidroperóxidos, peróxidos y radicales libres implicados en su formación y propagación. Como hemos visto previamente, los lípidos insaturados (como pueden ser linoleico o linolénico) al oxidarse forman hidroperóxidos lipídicos, que pueden formar radicales libres lipídicos que peroxidan, a su vez, a otros lípidos, entre ellos a los constituyentes de la membrana celular. Como resultado de la peroxidación, se produce lesión de la membrana y de otros constituyentes celulares (Nwanguma y col., 1999).

Las consecuencias de las reacciones propagadas por radicales libres se conocen (Repetto, 1997): se produce la alquilación de elementos celulares (membranas celulares, retículo endoplásmico, enzimas, ADN); se origina un déficit metabólico o defensivo; puede aparecer cáncer y mutagénesis (trastorno de la reproducción celular); se produce peroxidación de lípidos celulares (fosfolípidos de membranas); rotura de membranas y necrosis.

En cuanto al riesgo tóxico de los aceites calentados, se considera que en la extrapolación de los datos establecidos en animales de experimentación a la especie humana, debe tenerse en cuenta que las dosis administradas deberían de ser muy elevadas.

Tenemos que tener en cuenta que la ingesta humana de aceites y grasas supone, aproximadamente, un 30% de las calorías diarias ingeridas (aproximadamente 40% en España). De estas grasas, sólo una pequeña proporción estaría constituida por grasas de fritura. Si bien el consumo de estas grasas puede representar un peligro potencial, a corto plazo y con una alimentación equilibrada, no representa la gravedad que podría deducirse de los estudios

experimentales. De todas formas, el potencial tóxico existe, por prácticas inadecuadas en el uso de los aceites (los calentamientos y enfriamientos alternativos son más nocivos que un calentamiento prolongado único) (Morales, 2006).

Algunos estudios epidemiológicos muestran una alta incidencia de cáncer de mama y gástrico en países con alto consumo de grasas insaturadas (de más fácil peroxidación). Por otro lado, las enfermedades arteriales coronarias pueden, en parte, ser causadas por consumo de productos de oxidación lipídica. La ingestión de alimentos ricos en lípidos peroxidados se ha relacionado, recientemente, con efectos negativos a largo plazo, tales como: la formación de ateromas y carcinomas, procesos de inflamación y envejecimiento celular, etc. (Morales, 2006).

1.3. LAS GRASAS DE LA DIETA. SALUD Y ENFERMEDAD

Los aceites y grasas han formado parte de la dieta humana desde la prehistoria. El hombre al ser omnívoro, consume tanto grasas procedentes de tejidos animales como vegetales. En ambos casos, la grasa puede formar parte de tejidos estructurales (grasas ocultas) o de tejidos de reserva (grasas visibles).

Es esencial para la salud ingerir cantidades adecuadas de grasas alimentarias. Además de cubrir las necesidades energéticas, su consumo debe ser suficiente para satisfacer las necesidades de ácidos grasos esenciales y vitaminas liposolubles. El consumo mínimo necesario para mantener un estado de buena salud varía tanto a lo largo de la vida de una persona como entre diferentes individuos.

Existe una gran variedad de contribuciones nutricionales de los lípidos en los alimentos, entre ellas caben destacar (Morales, 2006):

- La palatabilidad y la aceptabilidad del alimento.
- Reserva y suministro de energía metabólica.
- Suministro de lípidos estructurales.
- Provisión de ácidos grasos esenciales, que juegan papeles importantes en la estabilización de las membranas biológicas y en actividades fisiológicas.

Además de las importantes funciones que juegan los lípidos desde el punto de vista nutricional existe una relación clara entre la ingesta lipídica y determinados estados patológicos (Morales, 2006):

- Almacenamiento lipídico. La obesidad: el aumento en la cantidad de tejido adiposo a límites superiores a los deseados, está asociado con expectativas de vida reducida, aumento susceptible de la diabetes, enfermedades cardiovasculares, algunos tipos de cáncer, y muchos otros aspectos de una salud deficiente.
- Enfermedad cardiovascular: implica cambios graduales en los vasos sanguíneos que producen la restricción u obstrucción del flujo sanguíneo a los órganos o a los tejidos (arteriosclerosis y trombosis). Hay recomendaciones dietéticas que consisten en reducir la grasa total y la ingesta de ácidos grasos saturados y reemplazar algunos ácidos grasos saturados por poliinsaturados.
- Intolerancia a la glucosa y la diabetes: de los dos tipos principales de diabetes existentes, nos centramos en la no-insulino-dependiente, donde se produce insulina pero los tejidos son

resistentes a ella y tienen alterada su capacidad para hacer uso de la insulina disponible. Esta condición está asociada con la obesidad, altas concentraciones de triacilgliceroles (como VLDLs), hipertensión, y un incremento a la tendencia a desarrollar arteriosclerosis. Mientras que antes la diabetes se consideraba como una enfermedad del metabolismo de los carbohidratos, actualmente se sabe que un metabolismo graso defectuoso es igualmente importante. La principal implicación práctica ha sido un cambio radical en el tipo de dietas para la diabetes, donde se trata de reducir la ingesta de energía total para evitar la obesidad y aumentar las proporciones de ácidos grasos poli-insaturados para controlar la hiperlipoproteinemia.

Además de los casos citados hay estudios que relacionan la presencia de determinados tipos de grasa en la dieta con otras enfermedades tales como el cáncer, enfermedades inflamatorias y alergias y desórdenes del comportamiento. Los resultados, en la mayoría de los casos no son del todo concluyentes, y se continúa trabajando en ellos.

1.4. ESTRÉS OXIDATIVO

El estrés oxidativo se puede definir como un desequilibrio entre sustancias oxidantes y antioxidantes a favor de las primeras, bien por un exceso de oxidantes, por un defecto de antioxidantes o por una combinación de ambas situaciones.

Las sustancias oxidantes son fundamentalmente especies reactivas de oxígeno (ERO), que se producen de forma fisiológica como consecuencia del metabolismo aeróbico, ya que durante éste, el oxígeno es el aceptor final de los electrones. La reducción del oxígeno requiere cuatro electrones y se reduce electrón a electrón de forma que en los pasos intermedios se puede dar lugar a productos tóxicos (Figura 2).

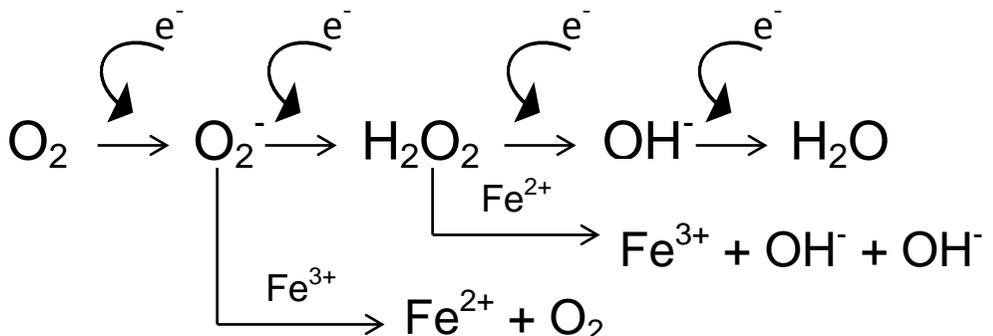


Figura 2 Proceso de reducción del oxígeno

Entre las ERO encontramos:

- *Radical superóxido (O_2^-)*: es producido por una variedad de reacciones biológicas, destacando la cadena de transferencia electrónica mitocondrial en la que los electrones son transferidos desde la forma reducida del coenzima Q al oxígeno, formándose este anión.
- *Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)*: es producido por enzimas oxidasas, muchas de las cuales se encuentran en

orgánulos oxidativos llamados peroxisomas. También se pueden formar peróxidos orgánicos muy tóxicos mediante la oxidación, por el oxígeno, de compuestos que contienen dobles enlaces, como pueden ser los ácidos grasos insaturados de las membranas. Como el peróxido de hidrógeno puede difundir a través de las membranas, el daño de los radicales no se limita a una localización celular en particular.

- *Radical hidroxilo (OH^{\cdot})*: es producido a partir del anión superóxido o peróxido de hidrógeno en una reacción catalizada por metales. Es la especie más reactiva de todas y puede tomar parte en las reacciones en cadena de radicales libres. Como son altamente inestables, son las especies más tóxicas.

Dentro de los oxidantes también podemos encontrar: hidroperóxido orgánico, radicales alcoxi- y peroxi-, ácido hipocloroso y peroxinitrito.

Las ERO incluyen radicales libres que tienen una vida media muy corta y una gran reactividad, por lo que se combinan con facilidad con el ácido desoxirribonucleico (ADN), proteínas y lípidos (Figura 3), produciendo cambios en su estructura y propiedades que, consecuentemente, pueden dar lugar a daños celulares o incluso sistémicos.

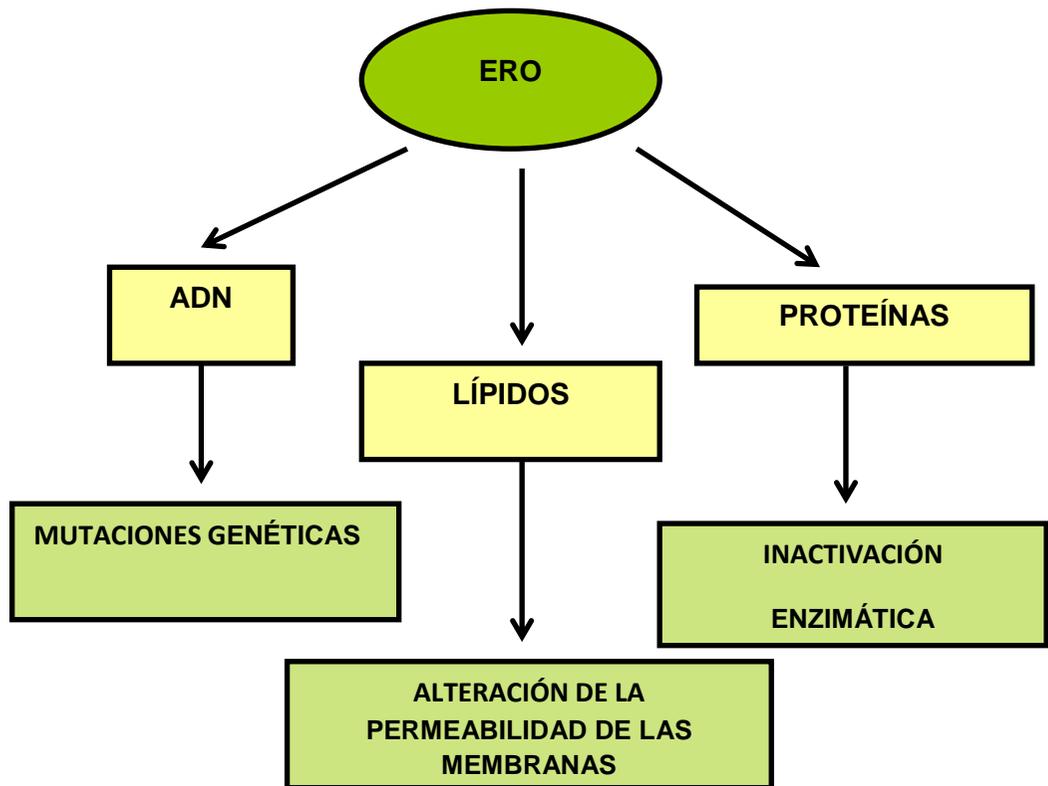


Figura 3 Efectos principales de las especies reactivas de oxígeno

La molécula de ADN es especialmente susceptible a daños oxidativos. El oxidante responsable del daño es el radical hidroxilo, ya que, ni peróxidos de hidrógeno ni radicales peróxidos pueden reaccionar directamente con el ADN. El ataque del radical hidroxilo produce tres tipos de daño en el ácido desoxirribonucleico:

- Hidroxilación
- Rotura del anillo
- Fragmentación

Las lesiones resultantes son, normalmente, productos de reacciones secundarias que suceden después del ataque inicial del radical. Existen alrededor de 100 tipos de lesiones diferentes del ADN como resultado del ataque inicial del radical hidroxilo a las bases nitrogenadas. Las lesiones del ADN usadas comúnmente como biomarcadores son la 8-hidroxidesoxiguanosina (8-OHdG) y la 2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidina (FapyG). Ambas son consecuencia del ataque del radical hidroxilo a la desoxiguanosina y cuya diferenciación se basa en una reacción secundaria. Estas lesiones pueden detectarse directamente en el ADN o por ensayos en orina.

Se han descrito métodos analíticos específicos para detectar biomarcadores de daño oxidativo en el ADN. Las especies generadas por los radicales libres junto con las bases nitrogenadas pueden unirse covalentemente con otras moléculas presentes en la célula, formando complejos intermoleculares. A menudo, el ejemplo más importante de este fenómeno, son las uniones cruzadas del ADN con las proteínas.

Los grupos hidroxilos pueden además atacar a los grupos fosfato de las bases nitrogenadas, produciendo diferentes lesiones, incluyendo el sitio libre de la base o el apurínico donde ha sido modificada mediante reacciones de oxidación. Un indicador de este daño es la presencia de bases libres en orina.

Otro ataque radicalario es la fragmentación de la desoxirribosa. La rotura de las hebras simples ocurre por la substracción del hidrógeno en posición C-4, produciendo la oxidación de la mitad del azúcar. Puede unirse a un segundo azúcar oxidado en la hebra

complementaria, causando la doble rotura. La rotura de las hebras de ADN puede producir mutagénesis o incluso la muerte celular.

Existen una gran variedad de mecanismos de defensa celulares destinados a proteger el genoma del ataque radicalario y a reparar el daño oxidativo. Algunas de estas defensas incluyen compartimentación de las moléculas sensibles y la defensa de la inhibición de la replicación del ADN por histonas y poliaminas. Si la protección del material genético no resulta exitosa, mecanismos de regulación celulares como la inducción de la apoptosis y la inhibición del progreso del ciclo celular pueden prevenir la transferencia de material genético dañado a las células hijas. Alternativamente, también los procesos de reparación del ADN pueden corregir los daños (A-Lien y col., 2001). Esta reparación es llevada a cabo por las enzimas ADN glicosilasas y endonucleasas apurínicas, antes de la replicación. Durante la postreplicación las reparaciones son llevadas a cabo mediante técnicas de reparación de lesiones durante o después del proceso de replicación.

El daño de proteínas mediado por radicales puede iniciarse por: pérdida de electrones, reacciones dependientes de iones metálicos y autoxidaciones de lípidos y proteínas. La consiguiente oxidación de proteínas es oxígeno dependiente, e incluye la propagación de diferentes especies radicalarias, principalmente los radicales alcóxidos, incluyendo diferentes categorías de especies reactivas y de sustancias estables.

La oxidación de proteínas tiene como resultado alteraciones en su estructura terciaria, lo que fomenta la agregación de proteínas y las

formaciones amiloides. A menudo las proteínas oxidadas son funcionalmente inactivas y el desdoblamiento de su estructura está asociado con un incremento en la susceptibilidad de las proteinasas. Las células pueden eliminar las proteínas oxidadas por proteolisis. Sin embargo, ciertas proteínas oxidadas son usadas por las células lo que, junto con posibles alteraciones del rango de producción de proteínas oxidadas, puede contribuir a su acumulación y a un aumento de los daños producidos por éstas durante el envejecimiento y algunas patologías como la diabetes, la aterosclerosis y enfermedades neurodegenerativas.

Los daños que conllevan a la inactivación de proteínas, bien de forma reversible o irreversible, pueden ser producidos por:

a- Radicales inducidos por radiaciones.

b- Sistemas catalizados por iones metálicos.

c- Oxígeno singlete y reacciones fotoquímicas.

d- Radicales endógenos.

e- Proteínas dañadas por radicales o carbonilos originados en otros procesos biológicos.

No obstante, existen varios mecanismos celulares para revertir estas lesiones oxidativas:

- Grupos tioles.
- Metionina.
- Bases de Schiff.

La carbonilación de proteínas resulta del ataque oxidativo en los residuos de arginina (Arg), lisina (Lys), prolina (Pro) o treonina (Thr) de las mismas. En animales, la carbonilación de proteínas ha sido ampliamente usada como medida de daño oxidativo, y se ha demostrado que se incrementa en los tejidos con la edad. Actualmente, el ensayo más sensible para medir el ataque oxidativo general a proteínas es la medida de formación de grupos carbonilos, los cuales son resultado del ataque de radicales libres reactivos así como de radicales hidroxilos con grupos amino.

La medida de grupos carbonilos tiene como ventaja su simplicidad y como inconveniente su no especificidad cuando se utilizan preparaciones de tejidos crudos. El método de detección de grupos carbonilos que ha demostrado mayor especificidad y sensibilidad ha sido el de la reacción con 2,4-dinitrofenilhidrazina (Levine y col., 1990).

Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) sirven como un sustrato excelente en reacciones de peroxidación lipídica, por la presencia de grupos metilenos activos. Las uniones carbono hidrógeno (C-H) de los grupos metilenos activos tienen una energía de disociación muy baja, cediendo con facilidad estos átomos de hidrógeno en las reacciones radicalarias. La especial susceptibilidad de los PUFA a la peroxidación conlleva cambios lipídicos en las moléculas.

Las autooxidaciones de los lípidos en sistemas biológicos se producen mediante una serie de reacciones consistentes en tres fases:

1) Iniciación: a menudo es objeto de debate. Se produce por la reacción de ERO (oxígeno, radical peróxido o radical hidroxilo) con el sustrato lipídico o por colapso de hidroperóxidos lipídicos preexistentes por transiciones metálicas. En el caso anterior, la peroxidación ocurre por sustracción de un átomo de hidrógeno del carbono del grupo metileno del sustrato lipídico generando un radical lipídico con un carbono altamente reactivo.

2) Propagación: moléculas de oxígeno se unen rápidamente a los radicales lipídicos generados. Los radicales peróxidos pueden sustraer un átomo de hidrógeno de diferentes moléculas (ADN y proteínas) para formar, como producto de oxidación primaria, hidroperóxidos lipídicos. Alternativamente, sustancias antioxidantes como la vitamina E, pueden actuar como donadores de átomos de hidrógeno, generándose hidroperóxidos lipídicos y radicales fenoxilos derivados de la vitamina E, relativamente inertes. En ausencia de antioxidantes y otros inhibidores, los radicales peróxidos lipídicos pueden sustraer el átomo de hidrógeno de otra molécula lipídica, produciendo un nuevo carbono activo en un radical lipídico, lo que conlleva a la propagación de las reacciones radicalarias.

Los metales de transición tienen un interés particular en la peroxidación lipídica (LPO). En la transición de la LPO catalizada por metales, el radical hidroxilo es el iniciador primario de las especies radicalarias. No obstante, cationes metálicas como los iones ferroso y férrico, pueden aumentar la producción de radicales hidrófilos iniciadores, catalizando la propagación de cambios en la LPO por descomposición de los hidroperóxidos lipídicos en productos oxidados.

Resultan así, radicales alcóxidos y peróxidos capaces de iniciar nuevos cambios radicalarios por interacción y adición con moléculas lipídicas. Otros metales activos redox, como los iones cobre, pueden catalizar esta reacción.

3) Terminación: la reacción finaliza cuando se unen dos radicales dando lugar a un producto no radicalario estable, el cual no conllevará la propagación de cambios en la peroxidación lipídica.

Los productos de la LPO modifican las características biológicas de las membranas, modificando su estructura, lo que conlleva una disminución de su fluidez y un aumento de la permeabilidad. En la eliminación de los productos de peroxidación lipídica de la membrana es necesario reparar los daños en ésta, lo que es llevado a cabo por dos sistemas enzimáticos diferentes: las acciones secuenciales de la fosfolipasa A2 con GPx y la glutatión peroxidasa de hidroperóxidos lipídicos. La reducción de los hidroperóxidos fosfolipídicos a hidróxidos fosfolipídicos al mismo tiempo que se incorporan en la estructura de la membrana pone fin a la peroxidación lipídica de la misma.

Uno de los métodos existentes más utilizados para evaluar la peroxidación lipídica, es la cuantificación de los productos generados en ésta mediante su reacción con el ácido tiobarbitúrico (ATB) (Esterbauer y Cheeseman, 1990).

1.5. SISTEMAS DE DEFENSA ANTIOXIDANTE

Las ERO son eliminadas del organismo o inactivadas por distintos mecanismos, distinguiendo entre sistemas enzimáticos: catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR) y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, y no enzimáticos: GSH, β -caroteno, vitaminas C y E, etc. (Figura 4). De esta forma, los radicales superóxidos presentes en los tejidos serán transformados hasta peróxido de hidrógeno (H_2O_2) mediante una reacción catalizada por la enzima SOD. Estos peróxidos de hidrógeno podrán ser reducidos hasta moléculas de agua (H_2O) por reacciones diferentes en las que intervienen las enzimas CAT y GPx, respectivamente. Esta última requiere, para su actuación, dos moléculas de glutatión reducido (GSH) el cual a su vez será transformado hasta glutatión oxidado (GSSG) en el transcurso de la reacción. La enzima encargada de recuperar estas moléculas de GSH consumidas será la GR.

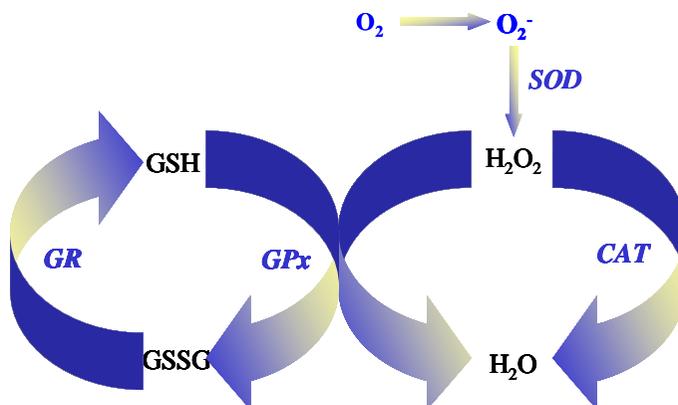


Figura 4 Principales sistemas enzimáticos antioxidantes celulares

1.5.1. Sistemas enzimáticos

1.5.1.1. Enzimas antioxidantes primarias

Estas enzimas están directamente implicadas en el procesamiento de las ERO.

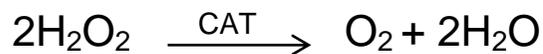
- *Superóxido dismutasa (SOD)*: son metaloenzimas omnipresentes en organismos aerobios, las cuales juegan un papel crucial en la protección de los organismos contra los efectos tóxicos causados por las especies reactivas de oxígeno, en particular, los radicales superóxido. Las SOD catalizan una reacción de dismutación que convierte los radicales superóxido en moléculas de oxígeno y peróxido de hidrógeno, el cual por otro lado, puede iniciar una cadena de reacciones para dar lugar a otras ERO y cada una de éstas, a su vez, causa determinados procesos patológicos:



La SOD está considerada como un miembro muy importante del sistema de defensa celular. Hasta la fecha se conocen cuatro isoformas con diferentes cofactores metálicos. Las SOD de cobre y zinc están exclusivamente distribuidas en eucariotas, mientras que las enzimas que contienen hierro, manganeso o níquel se encuentran predominantemente en mitocondrias de eucariotas o en procariontas. Estas isoformas,

presentan en eucariotas un alto grado de conservación tanto en la secuencia de nucleótidos como en la secuencia de aminoácidos.

- *Catalasa (CAT)*: es otra enzima antioxidante que contiene hierro y que tiene como grupo prostético la hematina. Está presente en todas las células aerobias que contienen un sistema citocrómico. La catalasa es más abundante en el hígado y es responsable de la descomposición catalítica del peróxido de hidrógeno a oxígeno y agua.



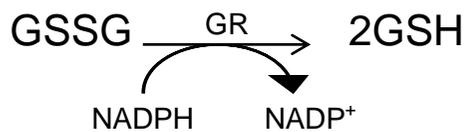
- *Glutación peroxidasa (GPx)*: las GPx son enzimas celulares que tienen como cofactor el selenio y catalizan la descomposición de hidroperóxidos, reduciéndolos a formas estables (hidróxidos) usando GSH específicamente como proveedor de electrones. La GPx del plasma se cree que es sintetizada directamente por la nefrona; el riñón es la principal fuente de producción de las mismas.



1.5.1.2. Enzimas antioxidantes secundarias

Están implicadas en la síntesis y suministro de glutati6n reducido para las primeras:

- *Glutati6n reductasa (GR)*: es una enzima que transforma el glutati6n oxidado en glutati6n reducido.



- *Glutamil cisteinil sintetasa (γ GCS)*: es una enzima clave en la sntesis de GSH, ya que el paso de regulaci6n en la sntesis de glutati6n reducido ocurre a nivel de esta enzima. El GSH ejerce un feed back negativo sobre esta enzima.

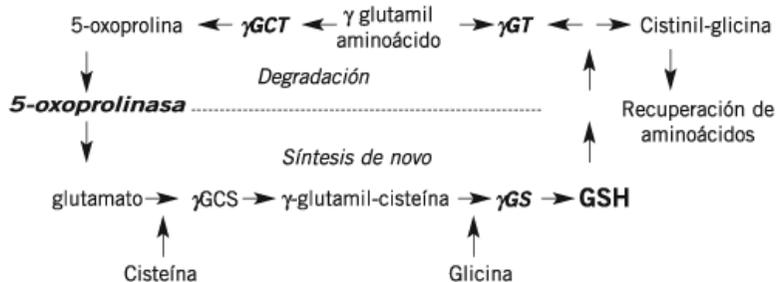


Figura 5 Ciclo del GSH

(Sarrasague, 2006)

- *Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH)*: esta enzima, juega un papel importante en la ruta de las pentosas monofosfato, regenerando el NADPH requerido para que el fosfato cambie

de estado oxidativo. Como primera enzima de la ruta de las pentosas fosfato, la G6PDH proporciona a la célula NADPH extramitocondrial mediante la oxidación de glucosa-6-fosfato a 6-fosfogluconato. Este NADPH mantiene el GSH a unos niveles constantes proporcionando equivalentes de reducción para la GR, la cual media la reducción de GSSG a GSH. Se sabe que la G6PD contiene muchos grupos sulfidrilos los cuales juegan un papel crucial en el mantenimiento de su estructura ternaria.

1.5.2. Sistemas no enzimáticos

1.5.2.1. Antioxidantes hidrofílicos

- *Glutación reducido (GSH)*: es uno de los antioxidantes más importantes (Figura 6). Actúa como secuestrador de radicales libres. También juega un papel en la reducción de varios enlaces disulfuro y mantenimiento de la proporción de proteínas en los estados oxidado/reducido.

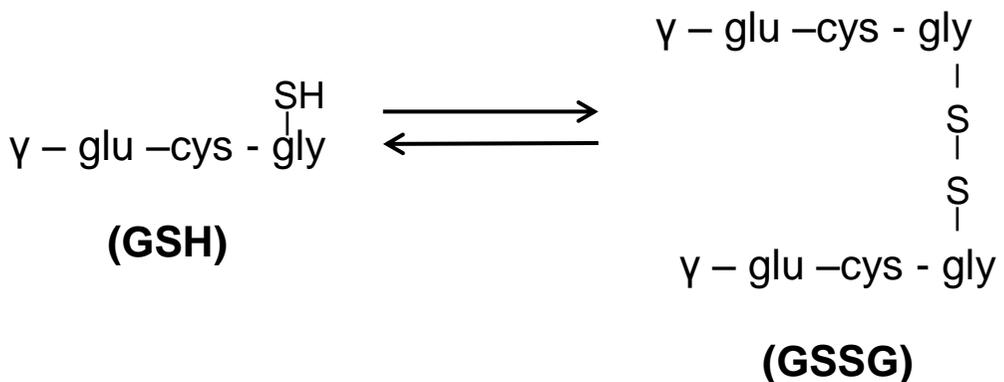


Figura 6 Sistema glutación reducido/oxidado (GSH/GSSG)

- *Vitamina C*: es un antioxidante soluble citoplasmático capaz de reaccionar con el anión superóxido y estabilizar el radical hidroxilo. Regenera la vitamina E.

1.5.2.2. Antioxidantes lipofílicos

- *Vitamina E*: es un antioxidante liposoluble de membrana que estabiliza al anión superóxido y al radical hidroxilo.
- *β-caroteno*: es un antioxidante liposoluble que actúa sobre el oxígeno libre reactivo.

Además de las vitaminas, los oligoelementos como el cobre, el zinc, el manganeso, el selenio y el hierro son necesarios incorporarlos al organismo a través de la dieta, porque conforman la parte activa del núcleo de las enzimas antioxidantes (Zorrilla, 2002).

2. OBJETIVOS

Revisando los antecedentes bibliográficos, se pone de manifiesto la importancia de conocer las implicaciones que tiene, en materia de Seguridad Alimentaria, el consumo de aceites sometidos a procesos repetidos de fritura. Se investiga, en concreto, los efectos tóxicos que pueden inducir una dieta suplementada con un aceite de oliva con un nivel de compuestos polares similar al límite marcado por la legislación (26,5% CP), inferior (12,5% CP) o superior (33,6% CP) en ratas Wistar expuestas de forma subcrónica (90 días).

Los objetivos específicos planteados en el presente trabajo son los siguientes:

1. Estudiar a nivel histopatológico las lesiones producidas tras la exposición en corazón, aorta, hígado y riñón.
2. Evaluar el estado oxidativo del tejido cardíaco, sanguíneo, hepático y renal, mediante medidas de peroxidación lipídica y determinación de enzimas antioxidantes, como: catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y glutatión reductasa.
3. Valorar el comportamiento de los individuos en relación a la ingesta de alimento y agua con el fin de identificar variaciones significativas entre los distintos grupos de experimentales.
4. Analizar diferentes parámetros bioquímicos en sangre para evaluar si dicha ingestión subcrónica produce algún tipo de consecuencia.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. EQUIPOS Y MATERIALES DE USO GENERAL

3.1.1. Dispositivos utilizados

- Agitador magnético Agimatic P-Selecta.
- Balanza analítica Mettler AJ100.
- Balanza semianalítica Mettler PJ400.
- PH-metro Orion SA 720.
- Baño de agua termostatzado, modelo Univeba de P-Selecta.
- Centrífuga Beckman Coulter, modelo Allegra 64R.
- Centrífuga de tubos eppendorf: modelo microspin^{plus}.
- Microscopio óptico Olympus BX61.
- Microscopio electrónico Philips CM10.
- Congelador -20º C, Saivod, modelo Turbo Fresh.
- Congelador -80º C Giratl, modelo Revco.
- Espectrofotómetro de doble haz Varian, modelo Cary-100.
- Ultra-Turrax T 25 basic IKA® -WERKE.
- Vortex V-1 de Boeco.
- Guillotina.

3.1.2. Material fungible

- Cubetas para espectrofotómetro.
- Pipetas automáticas de distintos volúmenes: 20, 100, 200, 1000 y 5000 microlitros (µL).
- Pipetas pasteur de vidrio.
- Puntas para pipetas automáticas.
- Tubos de centrífuga de 10 mL de pyrex.
- Tubos de centrífuga de fondo cónico desechables de 10 mL.
- Tubos de eppendorf de 1,5 y 2 mL.
- Papel de filtro Whatman.
- Tubos heparinizados.

3.2. REACTIVOS UTILIZADOS

A lo largo del trabajo experimental, se han consumido los siguientes reactivos:

- Ácido acético glacial: Panreac 141318
- Ácido clorhídrico: Panreac 141659
- Ácido etilendiaminotetracético (EDTA): C.A.S. 6381-92-6
- Ácido fólico (B6): Cecofar 023218
- Ácido fórmico: Merck 1.00264.1000
- Ácido meta-fosfórico: Sigma M-6288
- Ácido nicotínico (B2): Cecofar 052118
- Ácido tiobarbitúrico: Sigma T-5500
- Ácido tricloroacético: Merck 1.00807.1000
- Agua milliQ
- Agua oxigenada: Sigma H-0904
- Albumina sérica bovina: Sigma A2058
- Almidón de maíz: Cecofar 119503
- Azida sódica: Fluka 71289
- Azúcar glass: Labmusal 31
- Biotina (B6): Cecofar 023028
- Butilhidroxitolueno: Sigma B-1378
- Bicarbonato potásico: Sigma P-9144
- Bio-Rad®: Bio-Rad 500-00
- Butanol: Romil H083
- Calcio fosfato dibásico: Cecofar 022111
- Carbonato cúprico: Sigma 61167
- Carbonato de magnesio: Sigma M7179
- Caseína: Labmusal 04
- Celulosa microcristalina: Labmusal 09
- Cianocobalamina (B12): Cecofar 020966
- Cianuro potásico: Panreac 104967

- Citocromo C: Sigma C-3006
- Citrato férrico: Sigma F6129
- Citrato de potasio hidratado: Cecofar 046797
- Cloruro de colina (barbiturato): Labmusal 51
- Cloruro potásico: Sigma P-4504
- Cloruro sódico: Panreac 141659 / Merck 1.06404.0500 (dietas)
- Dihidronicotinamida adenina dinucleótido fosfato tetrasódico: Sigma N-1630
- 2,4-Dinitrofenilhidrazina: Sigma D-2630
- Etilendiaminotetraacetato disódico: Sigma E-1644
- Etanol: Fluka 02854
- Formaldehído en solución 37%: Merck 1.04003.1000
- Fosfato diácido de potasio. Panreac 141509
- Fosfato potásico monobásico (C.A.S. 7778-77-0)
- Gammaglobulina bovina: Bio-Rad 500.0005
- Glutaraldehido: Fluka 49631
- Glutation reductasa: Sigma G-3664
- Glutati3n reducido: Sigma G-4251
- Glutati3n oxidado: Sigma G-4376
- Guanidina: Sigma G-4505
- Hidroxicarbonato de zinc: Merck 29110.290
- Hidróxido potásico: Panreac 105021
- Hidróxido sódico: Panreac 141687
- Kit Randox SD125 (Superóxido dismutasa)
- Kit Hemoglobina: Spinreact refs. 1001230 y 1001232
- Kit Randox RS 505 (Glutati3n peroxidasa)
- Kit Randox GR 2368 (Glutati3n reductasa)
- Lauril sulfato sódico: Sigma L-4390
- Metanol de máxima pureza: Merck 1.06018.2500
- D,L-Metionina: Cecofar 017061
- Óxido de magnesio: Cecofar 056689
- Pantotenato de calcio: Cecofar 060749
- Piridoxina hidrocl3rico (B6): Sigma P9755-5g

- Retinol vitamina A palmitato: Roig Farma 3164322
- Riboflavina (B2): Sigma R4500-25G
- Selenito de sodio pentahidratado: Merck 1.06607.0025
- Sulfato de potasio: Merck 10153.0500
- Sulfato de potasio crómico dodecahidratado: Merck 1.01036.0250
- Tetraetoxipropano: Sigma T-9889
- Tiamina (vitamina B1): Cecofar 025304
- Tris(hidroxiometil)aminometano: Sigma T-1378
- Vitamina D3 (colecalciferol): Cecofar 120873
- Vitamina K (filokinona. K1): Merck 5.01890.0001
- Vitamina E (tocoferol): Cecofar 149765
- Xantina: Sigma X-2502
- Xantino oxidasa: Sigma X-4875
- Yodato de potasio: Merck 1.05051.0100

3.3. TRATAMIENTO DE ACEITES EMPLEADOS EN LA ELABORACIÓN DE LAS DIETAS

El tratamiento de fritura de los aceites fue realizado por la Dra. D^a Carmen Dobarganes en el Instituto de la Grasa (CSIC). Para ello se utilizó aceite de oliva virgen extra de la variedad Hojiblanca (suministrado por la empresa Hojiblanca SCA). Se usaron tres freidoras Taurus Prof 2 (Taurus, Lérida, España), similares a las que se utilizan para uso doméstico. Los aceites se utilizaron para freír patatas (unas cinco horas diarias). Las muestras finales tenían un contenido en compuestos polares de 12,5% (Frito I), 26,5% (Frito II) y 33,6% (Frito III), correspondiendo a valores por debajo, alrededor y por encima de lo establecido en la legislación. El nivel de degradación se evaluó con un medidor de la calidad del aceite, Testo 265 (Figura 7), de forma que al alcanzarse el nivel de compuestos polares deseado, se interrumpía el proceso de fritura.



Figura 7 Medidor de la calidad del aceite

Las muestras finales se corresponden con periodos de calentamiento de 25, 55 y 75 horas para los fritos I, II y III, respectivamente.

El aceite denominado “Inicial”, el cual no se sometió a ningún proceso de fritura, mostró un nivel bajo de compuestos polares (4,5% CP), dentro de los valores normales de aceites de oliva virgen y refinados de alta calidad. Al aumentar el tiempo de fritura, la degradación aumentó, aunque sólo los niveles de polímeros de triglicéridos (TGP) y monómeros de triglicéridos oxidados (oxTGM) se incrementaron de forma significativa. El nivel de diglicéridos (DG) prácticamente no se modificó, indicando que las reacciones hidrolíticas no fueron significativas a pesar del alto contenido en agua de las patatas.

En la Tabla 1 se reflejan los resultados del análisis de los compuestos polares.

Aceite de Oliva Virgen Extra	Compuestos polares (%peso en aceite)			
	TOTAL	Distribución		
		TGP	oxTGM	DG
Inicial	4,5	<0,1	2,1	1,9
Frito I	12,5	5,9	4,1	2,0
Frito II	26,5	13,9	10,1	2,0
Frito III	33,6	17,2	13,8	2,1

Tabla 11 Resultados del análisis de los compuestos polares

3.4. EL MODELO EXPERIMENTAL

Para comprobar los efectos tóxicos que produce la ingestión subcrónica de aceite sometido a diversos grados de fritura, se emplearon cincuenta ratas Wistar macho (Figura 8) de entre seis y siete semanas de edad, las cuales fueron adquiridas en el Centro de Producción y Experimentación Animal de Espartinas, perteneciente a la Universidad de Sevilla, portando su certificado de sanidad correspondiente.

Este modelo no consanguíneo es utilizado en experimentos que precisan de animales vigorosos y con una cierta variabilidad genética.

Los animales fueron alojados bajo condiciones ambientales controladas (descritas en el RD 1201/2005, de 10 de octubre, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos), con ciclos de luz/oscuridad de 12/12 horas. Durante el periodo de aclimatación (una semana), se les proporcionó comida peletizada (dieta de mantenimiento A04 de la casa comercial Panlab) y bebida *ad libitum*.

Transcurrido el periodo de cuarentena, se procedió tal y como se planteó el experimento.



Figura 8 Ratas Wistar macho utilizadas como modelo experimental

3.5. EL DISEÑO EXPERIMENTAL

Los animales se distribuyeron en cinco lotes de diez ratas cada uno (Figura 9). Para cada lote, se prepararon dietas diferentes. El primer lote (CONTROL) recibió una dieta estándar con un 5% de aceite mezcla de girasol y soja; la habitual en el mantenimiento de roedores. Los otros cuatro lotes recibieron una dieta suplementada con un 12% de aceite de oliva virgen sometida a distintos grados de fritura. En el grupo denominado INICIAL, el aceite era crudo, sin ningún tipo de tratamiento. El grupo FRITO I recibió una dieta fabricada con aceite con un 12,5% de compuestos polares, inferior al establecido por la legislación. El FRITO II, con un 26,5% (similar al límite permitido por la normativa) y el FRITO III, con un 33,6% de compuestos polares, superior al límite legal. Con estas dietas se alimentó a las ratas durante tres meses.

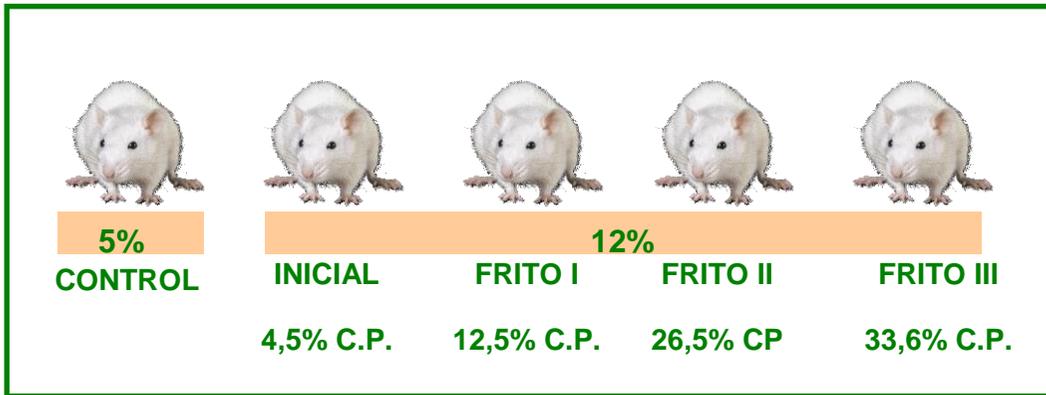


Figura 9 Esquema del diseño experimental

Durante el tiempo de exposición, se llevó un registro del aumento de peso en los distintos individuos, del consumo de comida por tipo de dieta y del consumo de agua. Del mismo modo, se llevó a cabo un seguimiento del estado físico y del comportamiento de los animales, para poder identificar posibles efectos tóxicos derivados del tratamiento.

3.6. PREPARACIÓN DE LAS DIETAS

A continuación, se muestra en la Tabla 12 Composición de las dietas experimentales (g/kg):

Ingredientes	Control	Inicial	Frito I	Frito II	Frito III
Cloruro de colina	2	2,4	2,4	2,4	2,4
D-L metionina	3	3,6	3,6	3,6	3,6
Complejo vitamínico*	10	11,9	11,9	11,9	11,9
Complejo mineral [^]	35	41,7	41,7	41,7	41,7
Lípidos					

A.S.	18,2	18,2	18,2	18,2	18,2
A.O.V.E.	0	89,8	0	0	0
A.O.V.E. FI	0	0	89,8	0	0
A.O.V.E. FII	0	0	0	89,8	0
A.O.V.E. FIII	0	0	0	0	89,8
Celulosa microcristalina	50	59,5	59,5	59,5	59,5
Harina de maíz	150	178,6	178,6	178,6	178,6
Caseína	200	238,1	238,1	238,1	238,1
Azúcar Glass	500	488,1	488,1	488,1	488,1
Energía total (KJ)	15,7	7,8	7,8	7,8	7,8
Proteína (% energía)	26,6	52,6	52,6	52,6	52,6
Lípidos (% energía)	4,4	12,8	12,8	12,8	12,8
COH (%energía)	69	34,6	34,6	34,6	34,6

COH, carbohidratos. C.P., compuestos polares. A.S., aceite de soja, A.O.V.E., aceite de oliva virgen extra (variedad Hojiblanca). A.O.V.E. FI, aceite de oliva virgen extra con un 12,5% CP. A.O.V.E. FII, aceite de oliva virgen extra con un 26,5% CP. A.O.V.E. FIII, aceite de oliva virgen extra con un 33,6% CP.

* Complejo vitamínico (/kg dieta): retinol 15-17,8mg, calciferoles 0,025-0,029mg, tiamina 6-7,14mg, riboflavina 6-7,14mg, piridoxina 7-8,33mg, cianocobalamina 0,1-0,119mg, tocoferoles 3-3,57mg, vitamina K 0,05-0,06mg, ácido fólico 2-2,38mg,

biotina 0,2-0,238mg, pantotenato de calcio, ácido nicotínico, 30-35,7mg, azúcar glass 9,91-11,8g.

^Complejo mineral (mg/g): NaCl 2,59-3,08g, KI 0,35-0,42mg, selenito de sodio 5H₂O 0,35-0,42mg, selenito de sodio anhidro 0,23-0,27mg, CuCO₃ 10,5-12,51mg, sulfato potásico de cromo (III) 19,25-22,9mg, ZnCO₃ 56-66,72mg, MgCO₃

0,12-0,14g, citrato férrico 0,21-0,25g, MgO 0,84-1g, K₂SO₄ 1,82-2,17g, citrato de potasio·H₂O 7,7-9,17g, fosfato dibásico de calcio 17,5-20,85g, azúcar glass 4,13-4,92g.

Tabla 12 Composición de las dietas experimentales (g/kg)

Los componentes se mezclaron en un recipiente apropiado, añadiendo primero el compuesto de menor cantidad y así sucesivamente. Al final, se añadieron el aceite y el agua, que daban una consistencia pastosa al preparado. La masa se extendió y se cortó en porciones de aproximadamente 3x3x2 centímetros (largo x ancho x altura) y se dejaron secar entre dos pliegos de papel secante hasta el día siguiente (Figura 10). Una vez secos los fragmentos, se almacenaron en el frigorífico a 4°C, evitando así el enranciamiento de los aceites.



Figura 10 Formato o presentación de la dieta suministrada a las ratas

Estas son algunas consideraciones sobre la dieta (Van Zutphen et al, 1999; Martín Zúñiga et al, 2001):

- La principal función de los hidratos de carbono es aportar energía a corto plazo.
- La fibra en la dieta es un componente que no aporta energía, en cantidades apreciables, ni otros nutrientes; pero sin embargo, tiene un papel regulador de todo el proceso digestivo, disminuyendo el tiempo de tránsito y aumentando el volumen de las heces.
- Los ácidos grasos de menor longitud de cadena son más absorbibles al ser menos dependientes de la lipasa y los ácidos biliares; además, se absorben vía sanguínea y no linfática. A medida que aumenta la longitud de la cadena, la digestibilidad disminuye.
- Respecto a los niveles óptimos de grasa en la dieta, los datos disponibles hasta el momento, relacionados con la longevidad y la aparición de tumores, apuntan a cifras cercanas al 5%, ya que estos niveles presentan las máximas ventajas y mínimos inconvenientes.
- Las vitaminas son sustancias orgánicas que se requieren en pequeñas cantidades. Su función biológica es actuar como biocatalizadores de las diferentes reacciones que tienen lugar en la materia viva, formando parte de distintos sistemas enzimáticos. Las vitaminas A, D, E y K son liposolubles, mientras que las vitaminas B y C, son hidrosolubles.

- La colina aporta el material básico a partir del cual se van a formar sustancias de gran importancia biológica; así la acetilcolina (neurotransmisor), forma parte de los fosfolípidos (lecitina), que participan en el transporte de lípidos y en la formación de las membranas biológicas. El incremento en la cantidad de grasa, las deficiencias en folato o vitamina B₁₂, y los aumentos de la temperatura ambiente incrementan las necesidades de colina.
- En un régimen de alimentación *ad libitum* (libre acceso al alimento las 24h del día), los animales de laboratorio tienden a consumir una cantidad constante de energía; por tanto, si la densidad calórica de la dieta se incrementa (aumento en el porcentaje de grasa), los animales consumirán menos alimento, lo que se traduce en un menor consumo generalizado de nutrientes y viceversa. En el caso de una dieta rica en grasa, hay que disminuir los hidratos de carbono tratando de que ambas dietas sean isocalóricas y, por tanto, no se vea afectada la ingestión global de proteínas, vitaminas y minerales.

3.7. SACRIFICIO DE LOS ANIMALES. TOMA DE MUESTRAS

Una vez transcurrido el tiempo de exposición, se procedió al sacrificio de los animales. Los animales se eutanasiaron dentro de una misma franja horaria (entre las 17:00 y las 19:00h p.m.), para evitar cualquier fluctuación debida al ciclo circadiano. Los lotes de ratas se sacrificaron en días sucesivos, ya que los tratamientos comenzaron en días sucesivos también. Seguidamente se extrajo sangre por punción cardiaca

(Figura 11), se realizó la apertura de la cavidad abdominal (Figura 12) y se extrajeron: corazón, aorta, hígado, riñón e intestino. De los órganos extraídos, se tomaron muestras para hacer estudios de anatomía patológica y muestras para las determinaciones bioquímicas.

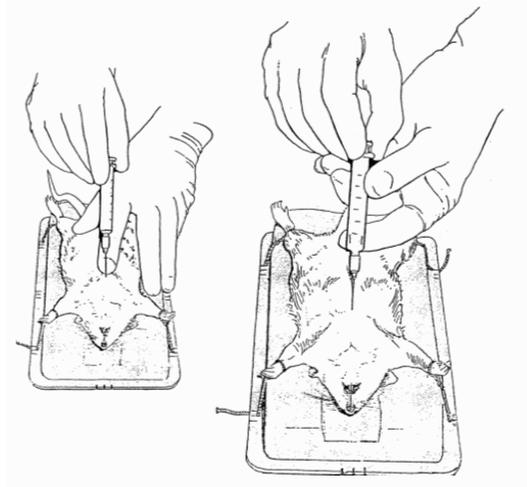


Figura 11 Extracción de sangre por punción cardiaca



Figura 12 Disección de una rata

3.7.1. Tratamiento de la sangre

La sangre se distribuyó en tubos heparinizados y se agitó suavemente, evitando así su coagulación. Posteriormente, se distribuyó la cantidad correspondiente en varios eppendorfs, para realizar el tratamiento oportuno:

- 60 µl de sangre para la determinación de hemoglobina.
- 500 µl de sangre para medir la actividad GR.
- 500 µl para la determinación de la actividad CAT.
- 500 µl para medir la actividad SOD.

A estos tres últimos tubos, se les añadió 1,5 ml de solución salina (NaCl al 0,9%), se agitaron suavemente y se centrifugaron a 3000 rpm durante cinco minutos a 4°C. Una vez centrifugados, se desechó el sobrenadante y se repitió el mismo proceso de lavado hasta cinco veces. Al final del proceso, se conservó el pellet.

Todos los tubos se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron en el congelador de -80°C hasta el momento de las determinaciones.

La sangre heparinizada restante se centrifugó a 3000 rpm durante veinte minutos (a temperatura ambiente). Se recogió el sobrenadante y se congeló en nitrógeno líquido para posteriormente guardarlo a -80°C con el resto de las muestras.

3.7.2. Tratamiento de las muestras de órganos

En esta sección se describe el tratamiento llevado a cabo en las muestras de órganos de cara a la realización de estudios de anatomía patológica.

Los órganos obtenidos se pesaron y se introdujeron, por separado, en placas de petri con una solución salina (NaCl al 0,9% p/v) atemperada a 4°C. Los órganos se limpiaron, con sumo cuidado, y se retiraron los restos de grasa. En el caso de los riñones, se retiró la cápsula renal (tejido fibroso conjuntivo que rodea cada riñón).

Una vez limpios los órganos destinados a estudios histopatológicos, se tomó un fragmento representativo de cada uno y se le dio el siguiente tratamiento; ya fuera para observación a microscopía óptica o electrónica:

- Para microscopía óptica, las muestras se fijaron con formol al 10% y se conservaron a temperatura ambiente.
- Para microscopía electrónica, se utilizó como fijador una solución de glutaraldehído compuesta por 2ml de glutaraldehído al 50%, 0,2041g de $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,0287g de $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 0,5g de NaCl en un volumen de 100ml. Las muestras se conservaron a 4°C.

Los estudios de histopatología se realizaron en colaboración con el Área de Toxicología de la Universidad de Córdoba.

3.7.3. Protocolo de homogeneización de órganos

En esta sección se describe el protocolo de homogeneización de los órganos para llevar a cabo las determinaciones bioquímicas correspondientes.

El tampón de homogeneización tiene la siguiente composición:

- 50mM $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$
- 1mM EDTA
- 1mg/ml BSA

El pH de la disolución se ajustó a 7,5 con KOH.

Los órganos se homogeneizaron en una proporción 1/10 p/v con el Ultra-Turrax®.

Los homogeneizados obtenidos se centrifugaron a 4000 rpm, durante 20 minutos a 4°C. El sobrenadante se recogió y se alicuotó en tubos eppendorf que se conservaron a -80°C para la posterior determinación de la concentración de proteínas, distintas actividades enzimáticas y la LPO.

3.8. DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS

Todas las determinaciones realizadas en este trabajo de investigación fueron puestas a punto en hígado, riñón, corazón y sangre.

3.8.1. Órganos

3.8.1.1. Determinación de la concentración de proteínas totales

La determinación de la concentración de proteínas en los homogeneizados de tejidos es un paso previo a las determinaciones enzimáticas ya que es necesario expresar dichas actividades en función del contenido en mg de proteínas de cada tejido.

Fundamento teórico

Se empleó el método de Bradford (1976).

El fundamento del método se basa en la combinación del colorante azul brillante de Coomassie G-250 (Bio-Rad®) con las proteínas dando lugar a un complejo azul con elevado coeficiente de extinción que le confiere una elevada sensibilidad. La formación del complejo es rápida, menos de

dos minutos, y queda disuelto aproximadamente durante una hora sin observarse precipitación.

Reactivos y disoluciones

- Reactivo Coomassie Brilliant Blue (CBB): Se diluye un volumen de reactivo Bio-Rad® en cuatro volúmenes de agua destilada. Se filtra a través de papel Whatman nº 1 y se deja en reposo a temperatura ambiente.
- Gammaglobulina bovina

Procedimiento

La determinación se realizó por calibración externa, interpolando los resultados de absorbancia de las muestras en una curva de calibrado preparada con γ -globulina.

Como muestra se tomaron 5 μ L de una dilución 1/2 del homogeneizado de tejido y se llevaron a 100 μ L con agua destilada.

A los 100 μ L de la disolución problema o estándar se añadieron 5 mL del reactivo Bio-Rad® previamente disuelto, se agitó, se dejó reposar durante 15 minutos y se procedió a la lectura de la absorbancia a 595 nm en una cubeta de cristal antes de los 50 minutos.

Todas las determinaciones (estándares y muestras) se realizaron por triplicado.

3.8.1.2. Estado de peroxidación lipídica (LPO)

Fundamento teórico

El método de diagnóstico más directo a la hora de valorar el estado de LPO en una muestra biológica sería la cuantificación de los hidroperóxidos formados en las etapas iniciales del proceso. Sin embargo, la naturaleza especialmente lábil y poco estable de estos productos ha hecho que se recurra a métodos indirectos, esto es, al análisis de productos secundarios o finales derivados de su metabolismo o descomposición.

De la gran variedad de métodos existentes para evaluar la LPO (lo cual indica que no existe un método de elección sencillo) uno de los más utilizados es la cuantificación de malondialdehído (MDA) y otros productos de degradación por medio de su reacción con el ácido tiobarbitúrico (ATB).

Estos compuestos, en condiciones de bajo pH y temperatura elevada, participan fácilmente en una reacción de adición nucleofílica con el ATB, generando un pigmento rojo fluorescente el cual puede ser determinado mediante espectrofotometría visible o fluorescencia. Este método tiene la gran ventaja de que la cuantificación es muy sencilla. Sin embargo, presenta una serie de claros inconvenientes que hay que tener en cuenta a la hora de considerar la medida de ATB como índice de LPO: así, ni todos los lípidos producen estos compuestos cuando sufren peroxidación, ni se producen exclusivamente como resultado de la LPO. Por consiguiente, se debe considerar este método solamente como un

indicador de la potencial existencia de daño peroxidativo sobre los lípidos celulares, y no como una medida de la LPO.

Se ha seguido el método descrito por Esterbauer y Cheeseman (1990), en el que el aducto formado por el MDA y el ATB se valora espectrofotométricamente a 532 nm.

Reactivos y Disoluciones

- Disolución de BHT al 1% en ácido acético glacial
- Lauril sulfato sódico (SDS) al 8%
- Ácido acético al 20%, pH 3,5 con NaOH
- Disolución de ATB al 0,8% preparada extemporáneamente en H₂O milliQ (requiere calentamiento y agitación para su disolución)
- Butanol
- 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP)

Procedimiento

Se debe trabajar con aproximadamente 1 mg de proteína en un volumen de 0,5 mL del homogeneizado, lo cual equivale a diluir los homogeneizados de acuerdo con los resultados obtenidos en la determinación de proteínas. Tras adicionar en el interior de tubos de vidrio, 0,5 mL del homogeneizado, se añadieron 25 µL de una disolución de BHT al 1% en ácido acético glacial, 0,2 mL de SDS al 8%, 1 mL de ácido acético al 20% y 1 mL de una disolución al 0,8% de ATB.

La mezcla de reacción se incubó durante 30 minutos a 95°C. Una vez enfriados los tubos, se adicionaron 3 ml de butanol para extraer el

aducto de color rosa formado durante la reacción. Se cerraron bien los tubos, se agitaron vigorosamente y se centrifugaron durante 10 minutos a 4.000 rpm para separar las dos fases. Con ayuda de una pipeta Pasteur, se recogió la fase superior y se leyeron las absorbancias a 532 nm frente al blanco, constituido por 0,5 mL de agua milliQ, tratado de manera análoga a las muestras.

Los resultados de absorbancia se interpolaron en una recta de calibrado preparada al efecto usando TEP como estándar.

Todas las muestras y disoluciones estándares se procesaron por triplicado. Los resultados se expresaron en nmol ATB/ g tejido.

3.8.1.3. Determinación de marcadores de estrés oxidativo

Para hacer un estudio de la posible inducción de estrés oxidativo provocado por la ingestión subcrónica de aceite sometido a distintos grados de fritura en las muestras de rata estudiadas (hígado, riñón, corazón y sangre), se valoraron las actividades de las siguientes enzimas antioxidantes en los homogeneizados: SOD, CAT, GPx y GR.

3.8.1.3.1. Determinación de la actividad SOD

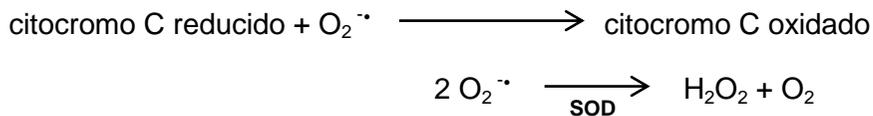
Fundamento teórico

Se utilizó el método descrito por McCord y Fridovich (1969) que consiste en determinar la disminución de la oxidación del citocromo C, ya que la SOD captura los radicales superóxido responsables de dicha oxidación.

Para medir la actividad de esta enzima, se añadió xantina como fuente de iones superóxidos, y xantino oxidasa para iniciar la reacción:



La reacción medida es la siguiente:



En la determinación se añade cianuro (500 μM) para inhibir la citocromo oxidasa y las peroxidasas de la muestra, asegurando de esta forma que el citocromo oxidado que se detecte sea debido a su reacción con los radicales superóxido y no por generación enzimática, y que los radicales superóxido sean los generados por la xantina/xantino oxidasa únicamente (no los generados por la actividad enzimática de la muestra).

Reactivos y Disoluciones

- Tampón SOD: $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ 50 mM y EDTA 0,1 mM, pH final 7,8 con KOH.
- Disolución de Xantina 50 μM en tampón SOD.
- Disolución de Citocromo C 10 μM en tampón SOD. Proteger de la luz.
- Cianuro 500 μM en tampón SOD.
- Xantino oxidasa 2,5 U /mL en tampón SOD. Extemporáneo.

Procedimiento

Los homogeneizados se diluyeron para obtener una concentración de proteínas de 2 mg/ml. Tras ensayos previos en el laboratorio, se determinó la dilución correcta.

La actividad SOD de las muestras se calcula en relación a una actividad máxima que se usa de referencia. En la microcubeta de referencia se añade: 510 μL de tampón SOD, 190 μL de agua milliQ, 100 μL de xantina, 100 μL de cianuro potásico 500 mM y 100 μL de citocromo C. Se realizó el mismo procedimiento en otra microcubeta pero añadiendo 180 μL de agua, y ambas se introdujeron posteriormente en el espectrofotómetro con el objeto de hacer el autocero.

Posteriormente se inició la reacción en la segunda cubeta añadiéndole 10 μL de xantina oxidasa y se midió la cinética a 550 nm cada 20 segundos, durante un periodo de tiempo total de 200 segundos.

Una vez obtenida la actividad SOD máxima (la referencia), se realizó la medida en las muestras. Para ello, se añadió en una microcubeta que actuaba como blanco, 510 μL de tampón SOD, 140 μL de agua milliQ, 100 μL de xantina, 100 μL de cianuro potásico 50 mM, 100 μL de citocromo C y 50 μL de la muestra. Se repitió la operación en otra microcubeta (con 130 μL de agua en lugar de 140 μL) y ambas se introdujeron posteriormente en el espectrofotómetro con el objeto de hacer el autocero. La reacción se inició en la segunda cubeta añadiéndole 10 μL de xantina oxidasa y se midió según la forma descrita anteriormente.

El cálculo de la actividad SOD se realizó de la forma siguiente:

$\Delta A_{\text{min}} (0-60)$ Referencia-----100%

ΔA_{min} Muestra-----x

$100-x = y$ (actividad SOD)

$y / 50 = z$

$z / b \cdot 10^{-3} = \text{resultados U/mg proteínas}$

$\text{mg /mL Bradford /dilución} = a \text{ mg /mL} = a \text{ } \mu\text{g /}\mu\text{L}$

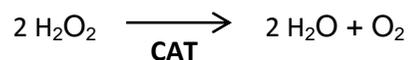
$a \text{ } \mu\text{g /}\mu\text{L} \times 50 = b \text{ } \mu\text{g}$

Siendo las mU los nmoles de citocromo que no son oxidados durante un min de reacción.

3.8.1.3.2. Determinación de la actividad CAT

Fundamento teórico

Se utilizó el método descrito por Beers y Sizer (1952) que consiste en determinar la desaparición de H_2O_2 a 240 nm.



Reactivos y Disoluciones

- Tampón CAT: PO₄H₂K 0,5M, pH 7 con KOH
- Peróxido de hidrógeno 10 mM.

Procedimiento

Hay que trabajar aproximadamente con 50-100 µg de proteínas por lo que se realizaron las diluciones correspondientes de los homogeneizados.

En una cubeta de cuarzo se añade 300 µL de tampón fosfato, 2070 µL de agua milliQ y 30 µL de extracto y el valor de absorbancia obtenido al medir frente al aire a 240 nm, se ajustó como cero. Posteriormente se añadieron 600 µL de peróxido de hidrógeno en la propia cubeta y se midió la cinética a intervalos de 20 segundos durante un tiempo total de 200 segundos.

El cálculo de la actividad CAT se realizó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{mU /mg} = [(\Delta A_{\text{min}} \times 1\text{mL} \times 10^3)] / (23 \times \text{mL muestra} \times \text{mg /mL}) \times \text{Dil}$$

Siendo las mU los nmoles de H₂O₂ consumidos durante un min de reacción.

3.8.1.3.3. Determinación de la actividad GPx

Fundamento teórico

Se utilizó el método descrito por Lawrence y Burk (1976) que consiste en determinar la desaparición del H₂O₂ a 340 nm acoplado las siguientes reacciones:



Reactivos y disoluciones

- Tampón GPx: PO₄H₂K 50 mM, EDTA 1 mM y Azida sódica 1 mM, pH 7,5 con KOH.
- Disolución de GSH 1 mM en tampón GPx.
- Disolución de GR 1 U/mL en tampón GPx.
- Disolución de H₂O₂ 0,25 mM.
- Disolución de NADPH 0,1 mM en bicarbonato potásico al 0,75%.

Procedimiento

Se debe trabajar aproximadamente con 50-100 µg de proteínas por lo que se realizaron las diluciones oportunas.

En una microcubeta de plástico se añadieron 600 µL de tampón GPx, 100 µL de NADPH, 100 µL de GSH, 152 µL de agua, 8 µL de GR y 40 µL de extracto, constituyendo el blanco frente al cual se realizó la medida. Se procedió de igual forma en la microcubeta problema (con 52 µL en lugar de 152 µL) y ambas se introdujeron en el espectrofotómetro con el objeto

de hacer el autocero. Posteriormente se inició la reacción en la segunda microcubeta añadiéndole 100 μL de H_2O_2 y se midió la cinética cada veinte segundos durante un tiempo total de 200 segundos.

El cálculo de la actividad GPx se realizó mediante la siguiente fórmula:

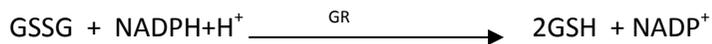
$$\text{mU /mg} = [(\Delta\text{Amin} \times 1 \times 10^3) / (6,22 \times 1 \times \text{Proteínas (mg /mL)} \times 0,04)] \times \text{Dil}$$

Siendo las mU los nmoles de NADPH consumidos durante un min de reacción.

3.8.1.3.4. Determinación de la actividad GR

Fundamento teórico

Se utilizó el método descrito por Calberg y Mannervik (1975) que consiste en determinar la desaparición de GSSG a 340 nm:



Reactivos y disoluciones

- Tampón GR: $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ 100 mM, EDTA 0,5 mM y KCl 200 mM, pH 7,5 con KOH.
- Disolución de NADPH 0,1mM en 5 mL de bicarbonato potásico al 0,75%.
- Disolución de GSSG 1mM en tampón GR.

Procedimiento

Se debe trabajar con aproximadamente con 50-100 µg de proteínas, por lo que se realizaron las diluciones oportunas.

En una microcubeta de plástico se añadieron 600 µL de tampón GR, 100 µL de NADPH, 200 µL de agua y 100 µL de extracto que será el blanco frente al cual se hará la medida. Ello se repite en otra microcubeta (con 100 µL de agua y no 200 µL), y ambas se incubaron a 37°C durante unos 10 minutos. Se introdujeron posteriormente en el espectrofotómetro con el objeto de hacer el autocero. Se disparó la reacción en la segunda cubeta añadiéndole 100 µL de GSSG y se midió la cinética cada veinte segundos durante un tiempo total de 200 segundos.

El cálculo de la actividad GR se realizó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{mU /mg} = [(\Delta\text{Amin} \times 1 \times 10^3) / (6,22 \times 1 \times \text{Proteínas (mg /mL)} \times 0,1)] \times \text{Dil}$$

Siendo las mU los nmoles de NADPH consumidos durante un min de reacción.

3.8.2. Sangre

3.8.2.1. Determinación de la concentración de hemoglobina

La hemoglobina se determinó con un kit comercial de Spinreact.

Fundamento teórico

La hemoglobina es oxidada por la acción del ferricianuro a metahemoglobina y mediante el cianuro se convierte en cianometahemoglobina.

La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de hemoglobina presente en la muestra ensayada.

Reactivos y disoluciones

- Ferricianuro de potasio: 0,60 mmol/l
- Cianuro de potasio: 0,90 mmol/l
- Dihidrógeno fosfato de potasio: 2 mol/l
- Patrón de hemoglobina (origen animal): 15g/dl

Procedimiento

Se mide la absorbancia a 540 nm de un blanco, el patrón y de cada una de las muestras. La medida se hace a temperatura ambiente.

El cálculo de la concentración de hemoglobina se realizó mediante la siguiente fórmula:

(A) Muestra / (A) Patrón x 15 (Conc. Patrón) = g/dl de hemoglobina en la muestra

3.8.2.2. Estado de peroxidación lipídica (LPO)

Se realizó en plasma, de la misma forma que se describió en un apartado anterior (3.8.1.2).

3.8.2.1. Determinación de marcadores de estrés oxidativo

Las actividades enzimáticas se determinaron de la misma manera que para los órganos; a excepción de la actividad glutatión peroxidasa para la que se empleó un kit específico (Randox RS 505).

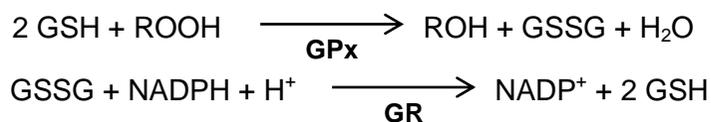
3.8.2.1.1. Determinación de la actividad GPx

Fundamento teórico

La GPx cataliza la oxidación del glutatión por el hidroperóxido de cumeno. Ante la presencia de glutatión reductasa y NADPH, el glutatión oxidado es convertido a la forma reducida (por la oxidación del NADPH a NADP⁺).

Se mide en este caso, la absorbancia a 340nm.

Estas son las reacciones que tienen lugar:



Reactivos y disoluciones

- Glutatión: 4 mmol/l
- Glutatión reductasa: ≥ 0,5 U/l, 90 mmol/l
- NADPH: 0,34 mmol/l
- Tampón fosfato: 0,05 mol/l; pH 7,2
- EDTA: 4,3 mmol/l
- Hidroperóxido de cumeno: 0,18 mmol/l
- Agente diluyente

Procedimiento

Se midió la absorbancia a 340 nm en el momento inicial y al cabo de 1 y 2 minutos. Se midió a 37°C.

El nivel de glutatión peroxidasa se calculó por la siguiente fórmula:

$$U/l \text{ hemolisado} = 8412 \times \Delta A \text{ 340 nm/min}$$

3.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos individuales de absorbancia de cada una de las medidas se transformaron en unidades de actividades enzimáticas o en las de cantidades de sustrato mediante el uso de hojas de cálculo (Excel).

La significación estadística de los resultados obtenidos en los distintos parámetros estudiados, expresados como media \pm error estándar (S.E.) se evaluó mediante análisis de la varianza (ANOVA), seguida del test de comparación múltiple de Tukey realizados con el paquete estadístico INSTAT de Graph Pad™. Las diferencias entre los lotes de experimentación fueron consideradas significativas a partir de un nivel de probabilidad del 5% ($p < 0.05$).

4. RESULTADOS

Durante todo el experimento, no se identificaron efectos tóxicos observables (tanto a nivel físico como comportamental), ni se registró ninguna baja.

En primer lugar, se verán aspectos relacionados con la anatomía patológica y, en segundo lugar, las determinaciones bioquímicas. Previamente, atenderemos a las mediciones realizadas en cuando a consumo de alimento y agua e incremento de peso.

4.1. EVOLUCIÓN DEL PESO Y CONSUMOS

La variación del peso en las ratas, así como el consumo de agua y alimento fueron seguidos durante todo el tratamiento. En cuanto a los pesos, no se encontraron diferencias entre los distintos grupos experimentales. La variable “peso” seguía, como era de esperar, una progresión ascendente hasta una fase de meseta o estabilización (Figura 13).

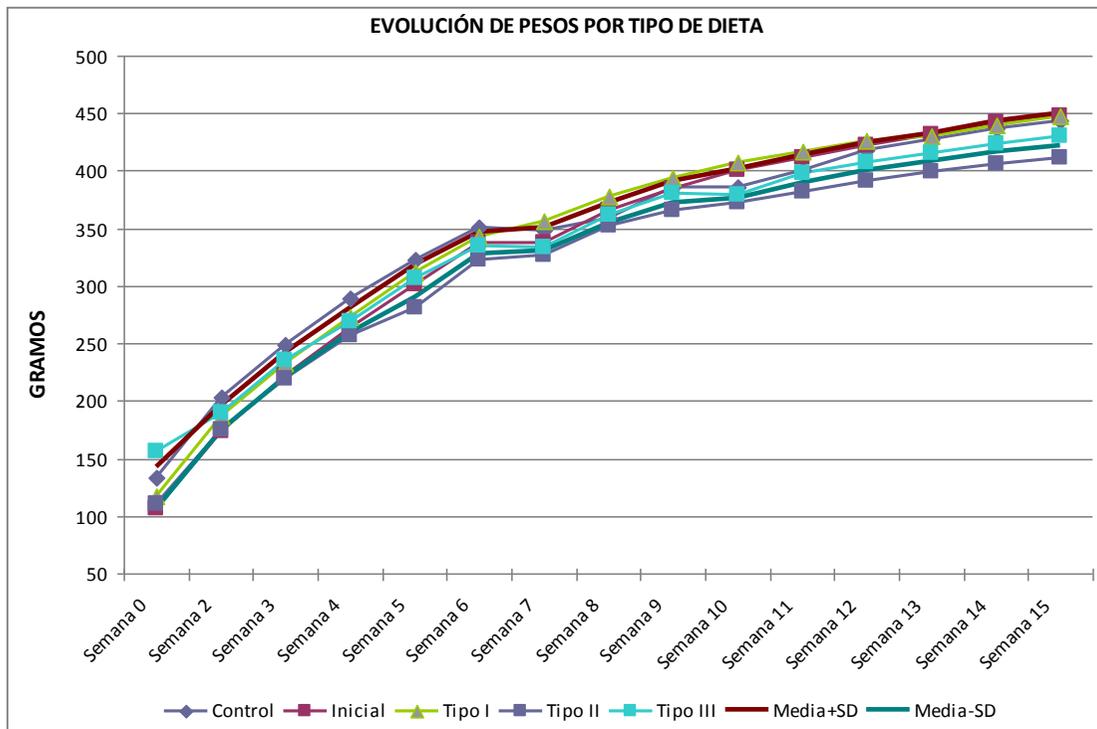


Figura 13 Evolución de pesos en los distintos grupos por tipos de dieta

En la siguiente gráfica, se representa la ganancia de peso. Se calcula de la siguiente manera:

$$G = 100(\Delta \text{peso semanal} / \text{peso inicial} - 1)$$

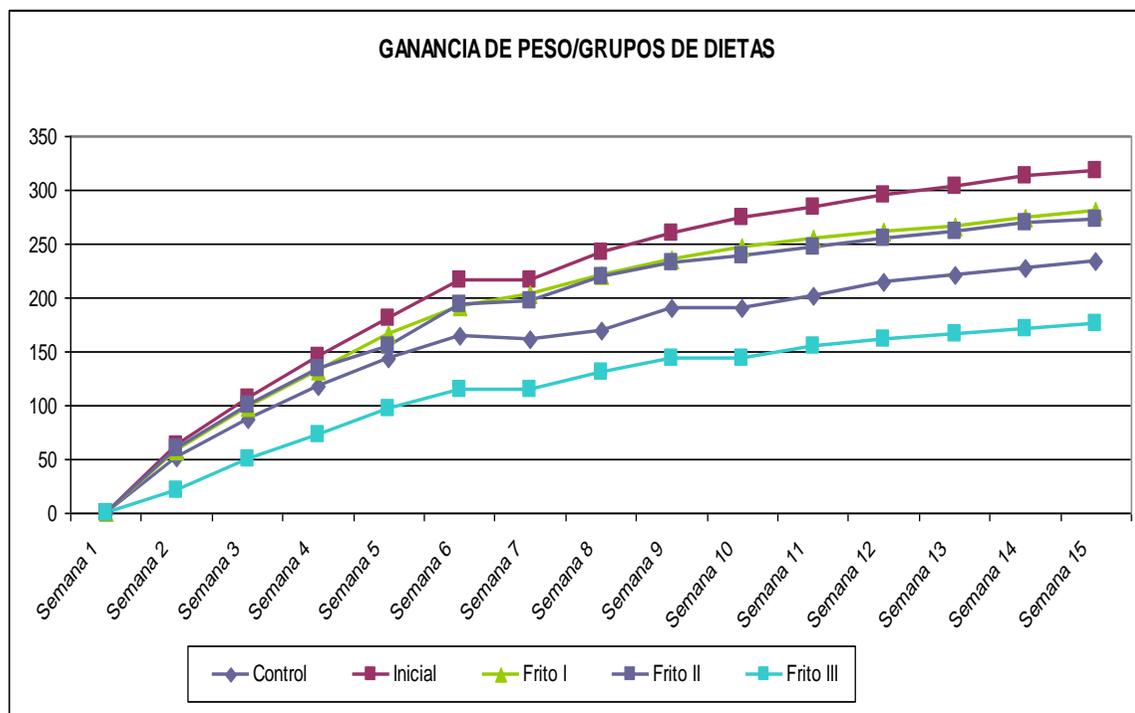


Figura 14 Incremento de pesos en los distintos grupos por tipos de dieta

El incremento de peso es mayor en las primeras semanas de tratamiento, atenuándose poco a poco con el transcurso del tiempo. Se observa que el incremento de peso es menor en las ratas alimentadas con el aceite Frito III (con un 33.6% CPs) y que aquellas que se alimentaron con la dieta Inicial (12% de aceite de oliva sin tratar), son las que exhibieron mayor incremento de peso.

Al analizar los datos registrados en los grupos experimentales con el programa estadístico INSTAT de Graph Pad™, se observan diferencias significativas entre algunos de los grupos (p valor < 0,00001; lo cual es muy significativo). Las diferencias se muestran en el lote Frito III, con respecto a los grupos Inicial (extremadamente significativo), Frito I y Frito II (muy significativo en estos dos últimos casos).

En cuanto al consumo de agua (Figura 15), si aplicamos el test estadístico, observamos diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales, siendo el grupo Control el que mayor consumo de agua presenta (seguido del grupo Frito I) y el grupo Frito III, el que menos (muy próximo a los valores de los grupos Inicial y Frito II).

En el consumo de alimento (Figura 16), con un p valor <0,0136, se observó una reducción en la ingesta en aquellos grupos alimentados con dietas suplementadas en aceites, posiblemente debido a una disminución de la palatabilidad entre la dieta control (con un 5% de aceite) y el resto (con un 12%).

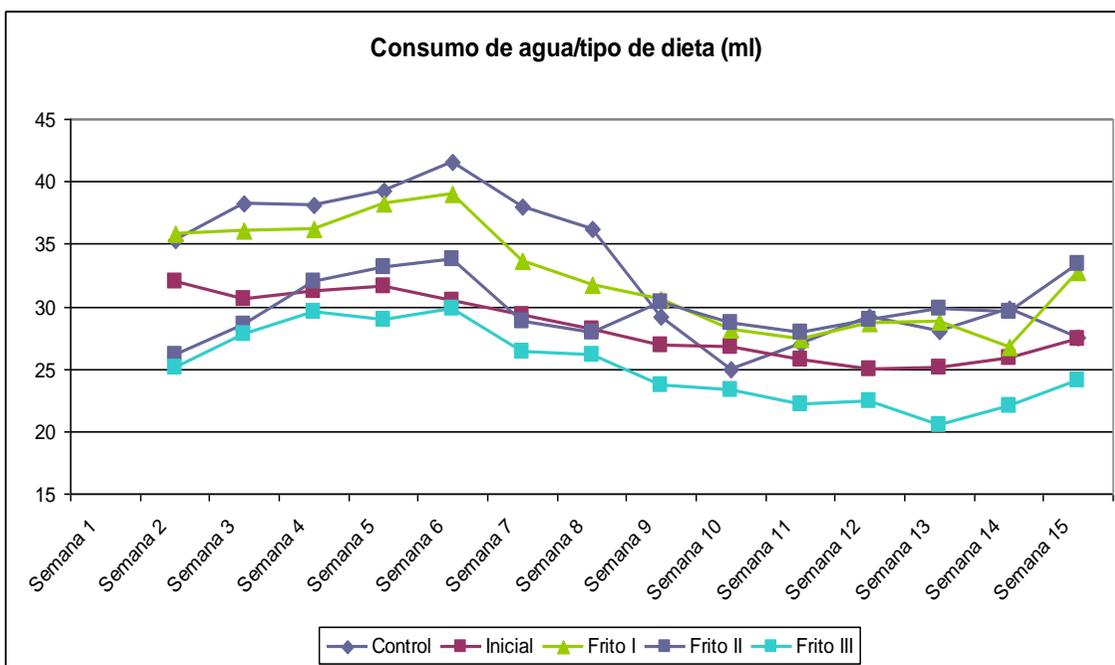


Figura 15 Consumo de agua en los distintos grupos por tipos de dieta

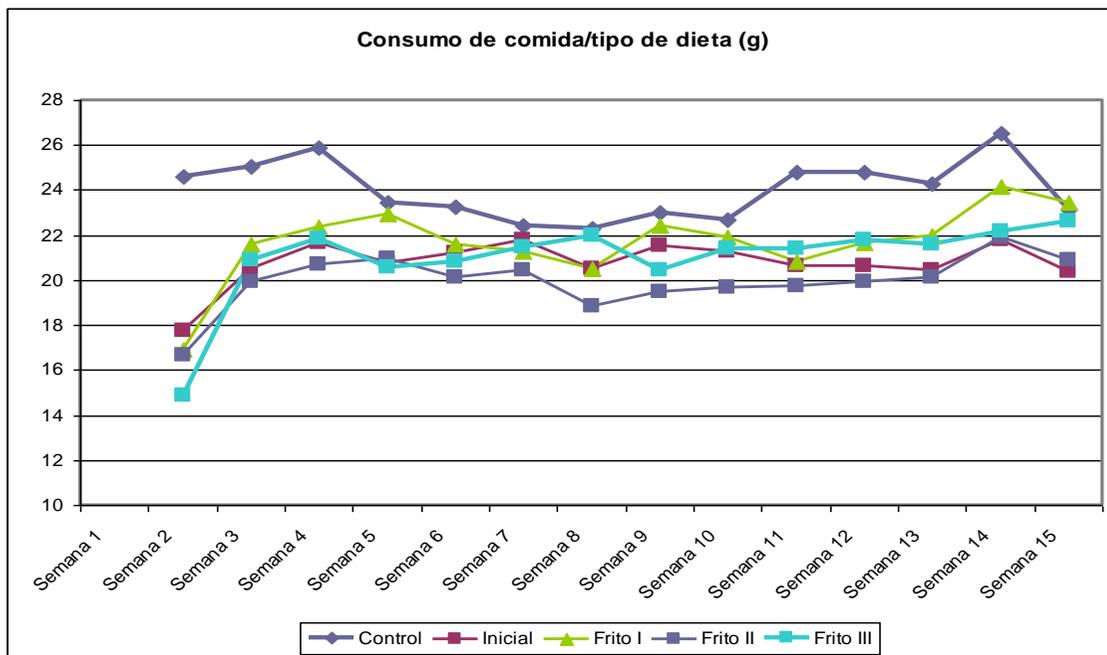


Figura 16 Consumo de alimento en los distintos grupos por tipos de dieta

Se representa, por otro lado, la medida de Eficacia de conversión de la ingesta, entendida como la relación entre la ingesta de comida y el incremento de peso en el cual revierte. Se calcula de la siguiente manera:

$$ECI = \Delta \text{ peso} / \text{ingesta comida} \cdot 100$$

Si comparamos entre los distintos grupos experimentales, vemos que en dietas isocalóricas, es más eficiente la que tiene un mayor porcentaje de grasa (independientemente de la cantidad de compuestos polares que posea).

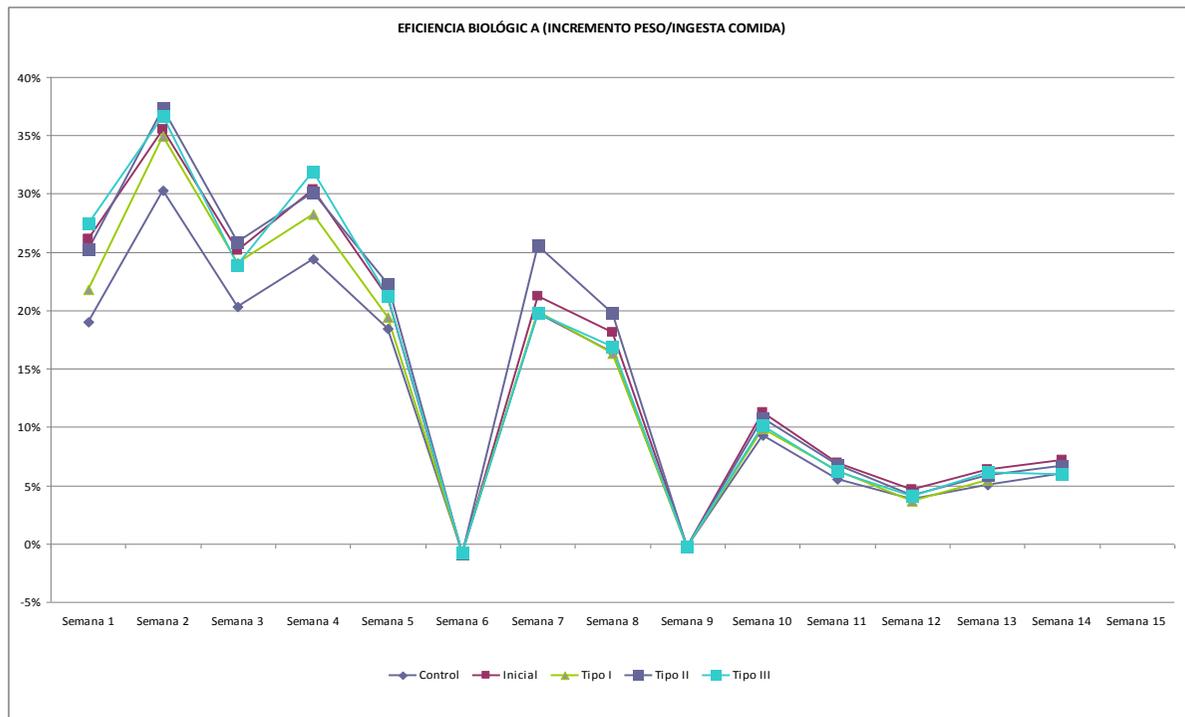


Figura 17 Eficacia de conversión de la ingesta en los distintos grupos experimentales

4.2. ANATOMÍA PATOLÓGICA

AORTA:

Se representa el peso de la aorta (g) por cada uno de los grupos experimentales. Existen diferencias significativas con respecto al grupo Inicial, tanto en el grupo Frito II (con un 26,5%CP) como en el Frito III (con un 33,6%CP).

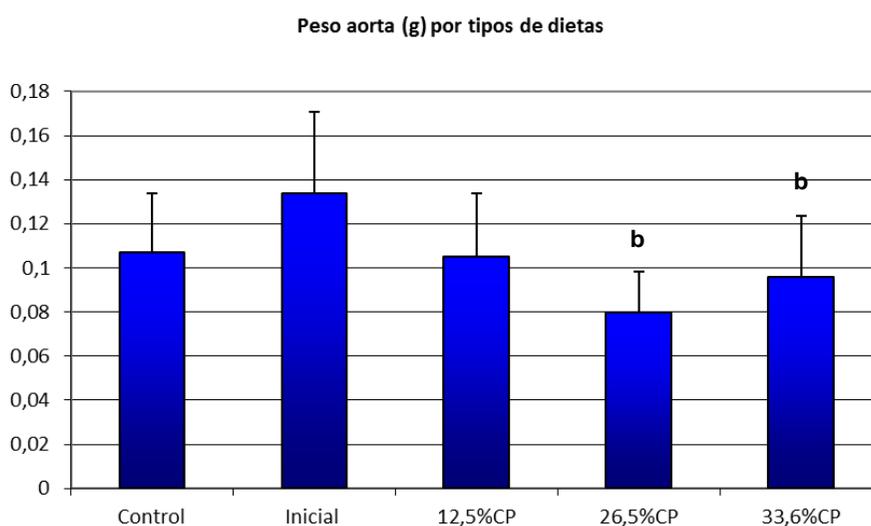


Figura 18 Peso de la aorta en los distintos grupos experimentales

La letra **b** representa diferencias significativas con respecto al grupo Inicial.

El índice somático, esto es, la relación entre el peso de un órgano y el peso total del animal, varía significativamente con respecto al Inicial, sólo en el grupo con un 26,5%CP (Figura 19).

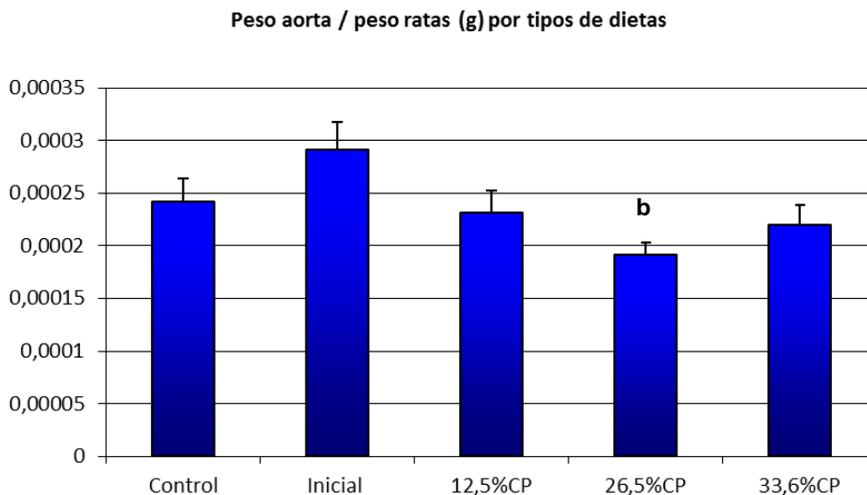


Figura 19 Índice somático en aorta en los distintos grupos experimentales

La letra b representa diferencias significativas con respecto al grupo Inicial.

La aorta de las ratas del grupo Control (Figura 20A) presenta una morfología normal observada mediante microscopio óptico (M.O.). Así, se aprecian bandas de elastina muy numerosas dispuestas normalmente, y entre ellas fibras elásticas con cierto grado de desorganización.

En los lotes de ratas tratadas se observa una alteración de la estructura de la aorta que consiste en general, en una homogenización de las fibras elásticas con pérdida de estructura, sobretodo de elastina, un aumento de las fibras de colágeno y necrosis generalizada

de las fibras lisas. Si bien se mantiene la alternancia de fibras lisas y fibras elásticas, además, de zonas de esteatomas y cristales.

Así, en el Frito I (12,5% CP) (Figura 20B), se observa, mediante microscopía óptica, que aunque las bandas elásticas se mantienen, han perdido su ondulación normal y parcialmente su organización, y presentan cierta homogenización.

En el lote Frito II (26,5% CP) (Figura 20C), la aorta muestra una desorganización parcial de las bandas elásticas, incluso con pérdida de su continuidad, con homogenización y presentándose entre ellas fibras musculares lisas con imágenes de necrosis.

En la aorta de las ratas del grupo Frito III (33,6% CP) (Figura 20D) observada mediante M.O., se acentúan todos estos procesos degenerativos descritos en los lotes Frito I y Frito II, y además muestran un adelgazamiento de la pared de la aorta, en la que las fibras de elastina han perdido su estructura normal y se aprecia necrosis de la fibra lisa.

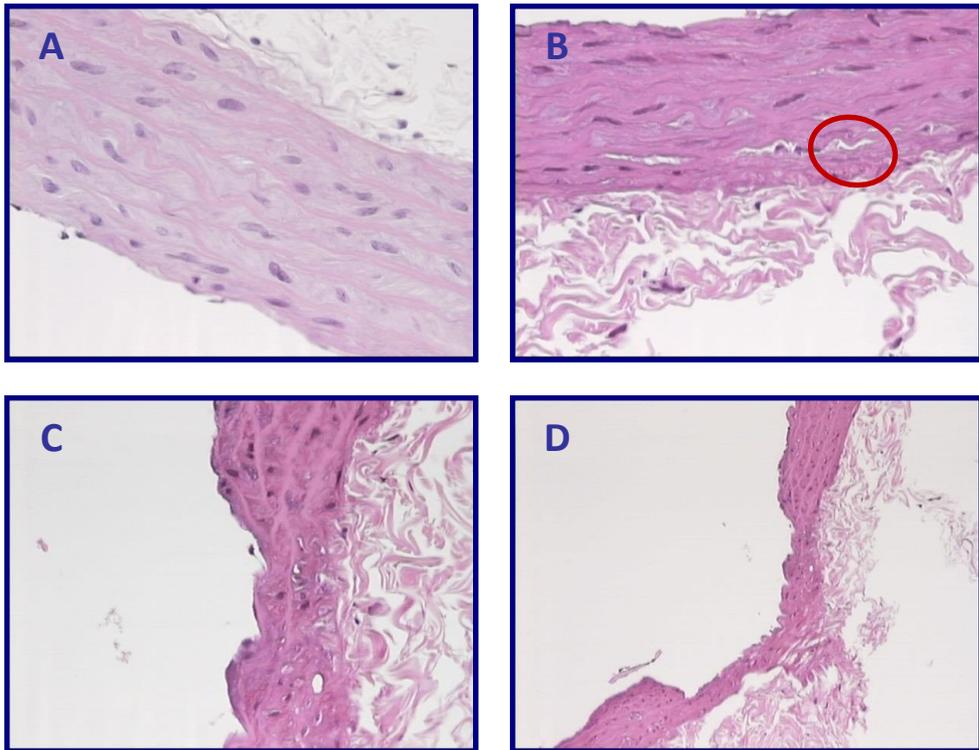


Figura 20 Alteraciones del tejido de la aorta (microscopio óptico)

Microscopio óptico (tinción hematoxilina-eosina). (A) Grupo Control: disposición normal de las bandas de elastina. (B) Lote Frito I (12,5% CP): pérdida de la ondulación normal (círculo). (C) Lote Frito II (26,5% CP): desorganización parcial de las bandas elásticas. (D) Lote Frito III (33,6% CP): adelgazamiento de la pared de la aorta.

CORAZÓN:

Se representa el peso del corazón (g) por cada uno de los grupos experimentales; no habiendo diferencias significativas entre los distintos tratamientos.

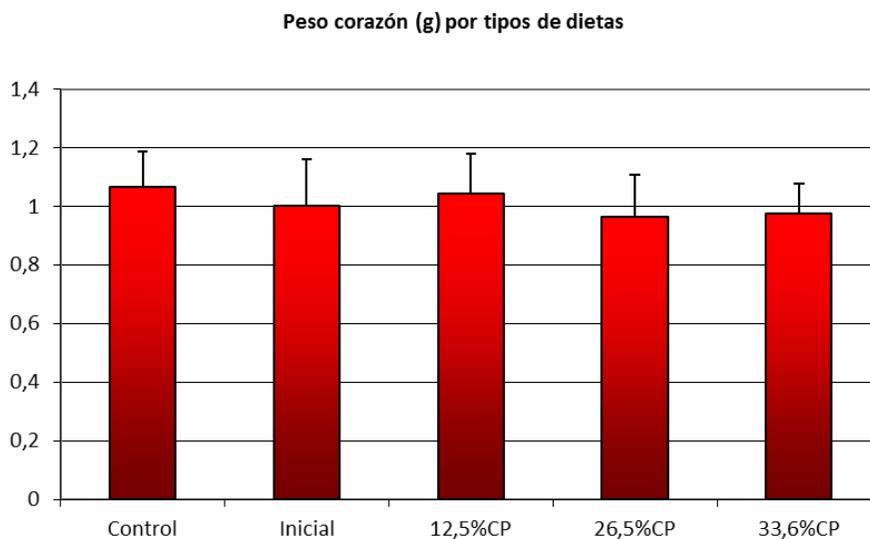


Figura 21 Peso del corazón en los distintos grupos experimentales

El índice cardiosomático no varía en ninguno de los lotes tratados ni con respecto al lote Control ni con respecto al grupo Inicial (Figura 22):

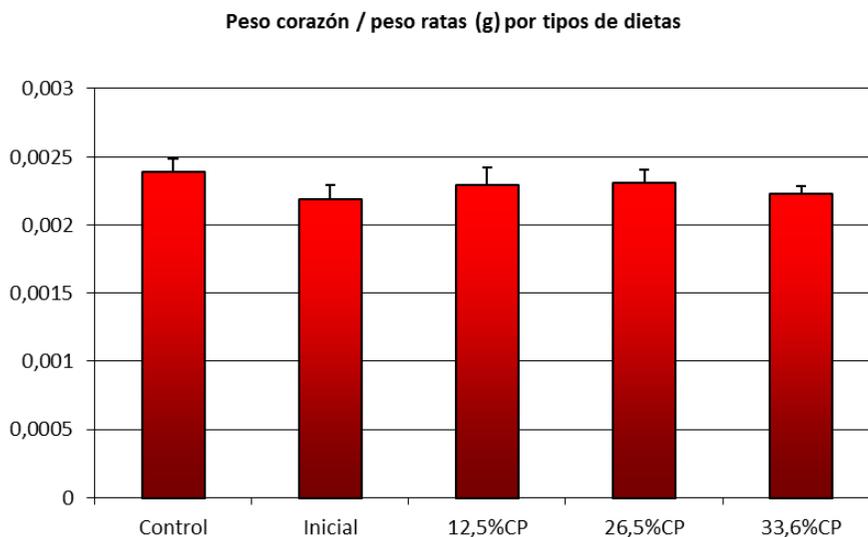


Figura 22 Índice cardiosomático en los distintos grupos experimentales

La estructura del corazón observada al M.O. de las ratas del grupo Control se caracteriza por una morfología normal, con células alargadas con núcleos centrales (Figura 20A) y al M.E se aprecia igualmente una estructura normal con un material contráctil uniforme y mitocondrias asociadas (Figura 23A).

En el corazón de las ratas de los lotes tratados con aceite sometido a distintos grados de fritura se observa una degeneración turbia con procesos necróticos y edema generalizado.

En el lote Frito II (con un 26,5% de compuestos polares), el corazón observado mediante microscopía óptica muestra amplias zonas de fibras con sarcoplasma hialinizado con núcleos basófilos y

pequeños (Figura 20B y C). Mientras que, al M.E. se detecta destrucción parcial del material contráctil con desorganización de mitocondrias, fibras con núcleos de bordes dentados, con gran pérdida de material contráctil muy basófilos y pequeños (Figura 23 B, C y D).

En las ratas del lote Frito III (con un 33,6% de compuestos polares) el corazón muestra amplias zonas de hialinización con fibras con claros signos de degeneración Zenkeriana (hialinización) y vacuolización celular. Amplias zonas de tumefacción y necrosis de las fibras con deflecación de las mismas (Figura 20D). Al M.E se observa pérdida parcial de material contráctil e hinchamiento de la mitocondria (Figura 23C).

El edema intersticial se presenta de forma constante en todos los lotes tratados.

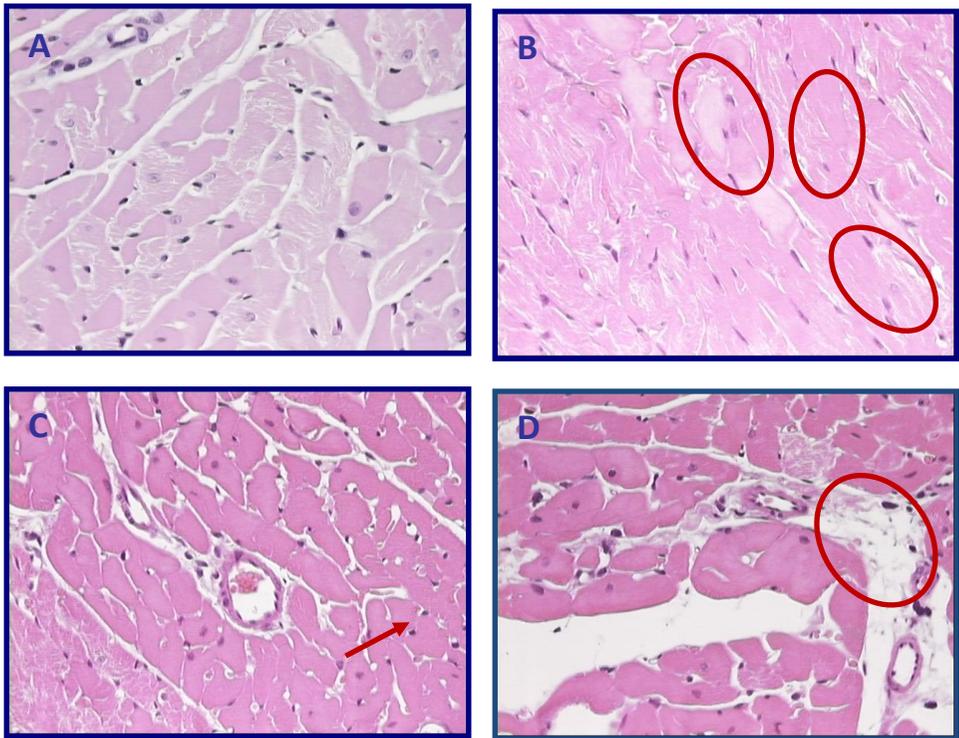


Figura 23 Alteraciones del tejido cardíaco (microscopio óptico)

Ratas expuestas de forma subcrónica a dietas elaboradas con aceite sometido a diversos grados de fritura. Microscopio óptico (tinción hematoxilina-eosina). (A) Grupo Control: tejido cardíaco normal con células alargadas. (B) Lote Frito I (12,5% CP): zonas hialinizadas (círculo). (C) Lote Frito II (26,5% CP): picnosis nuclear (flecha). (D) Lote Frito III (33,6% CP): edema generalizado (círculo).

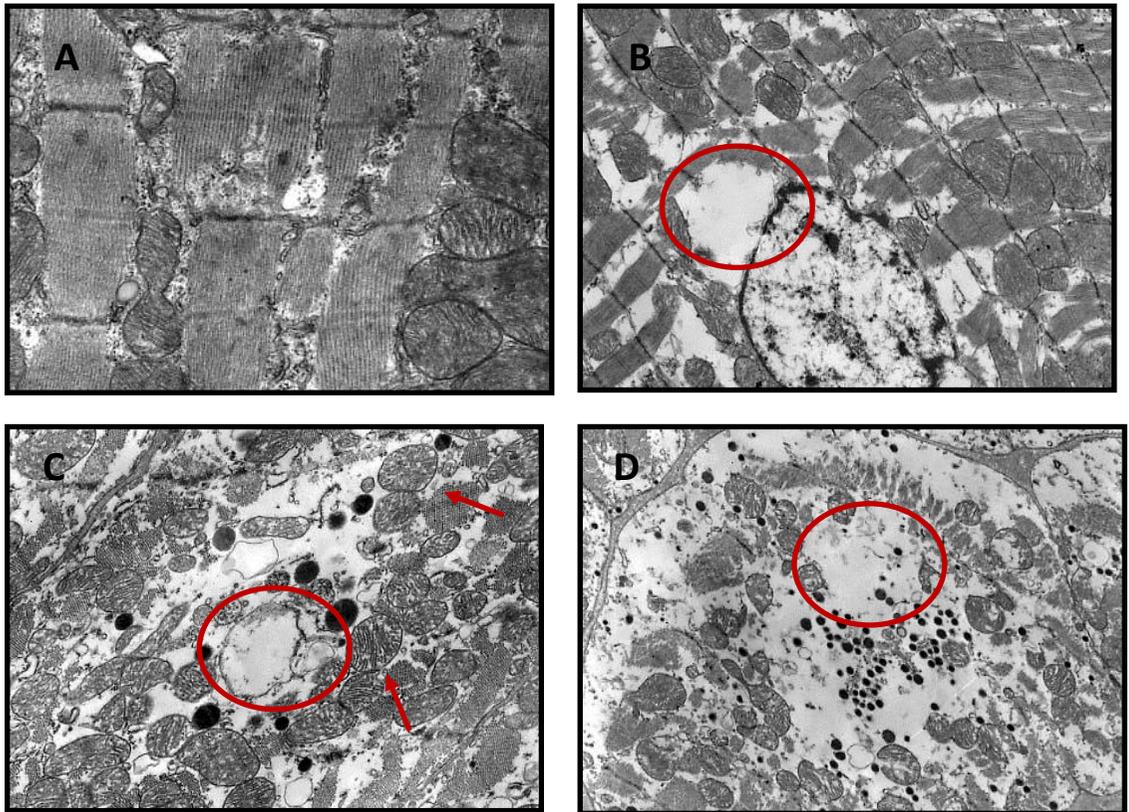


Figura 24 Alteraciones del tejido cardíaco (microscopio electrónico)

Ratas expuestas de forma subcrónica a dietas elaboradas con aceite sometido a diversos grados de fritura. Microscopio electrónico. (A) Grupo Control: material contráctil normal, con mitocondrias asociadas. (B) Lote Frito I (12,5% CP). (C) Lote Frito II (26,5% CP). (D) Lote Frito III (33,6% CP). Se aprecia desorganización del material contráctil (círculos) y tumefacción mitocondrial (flechas).

RIÑÓN:

Se representa el peso del riñón comparándolo entre los distintos grupos experimentales. No se encuentran diferencias significativas entre los distintos tipos de tratamientos.

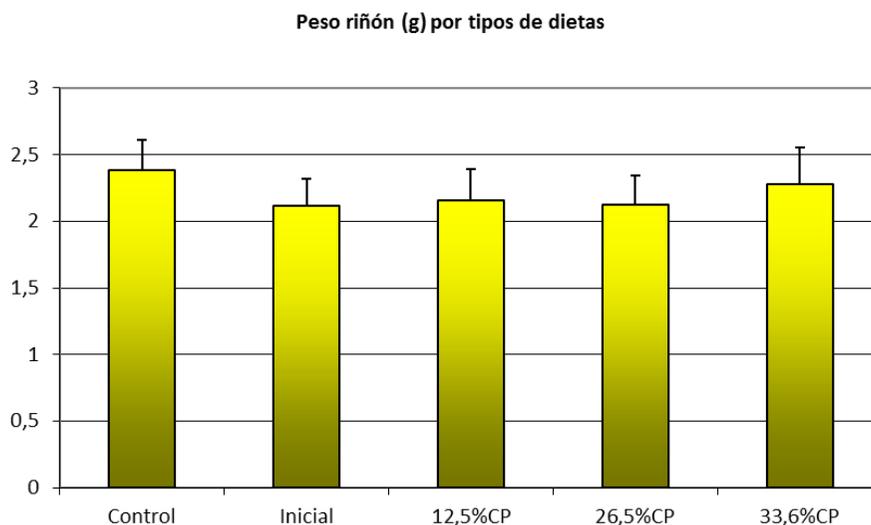


Figura 25 Peso del riñón en los distintos grupos experimentales

En el caso del riñón, el índice somático (Figura 26) presenta diferencias significativas en los grupos Frito I y Frito III, con respecto a los grupos Control e Inicial respectivamente.

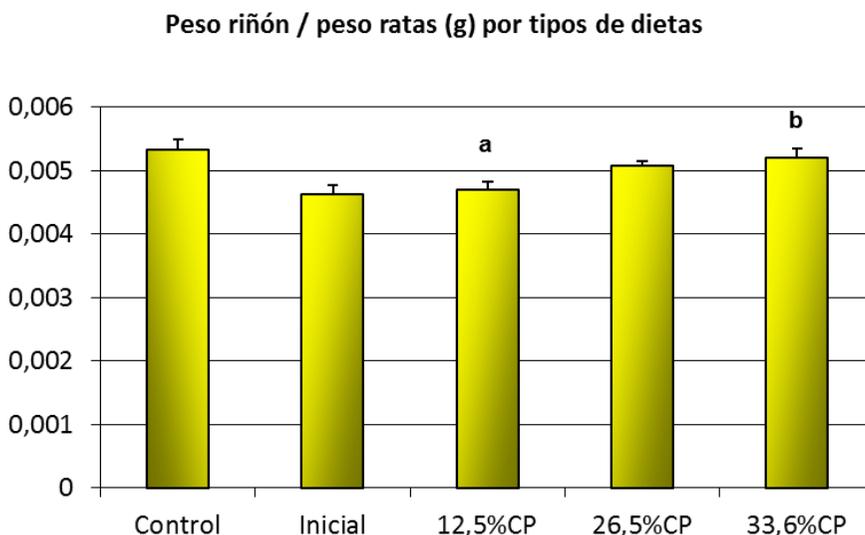


Figura 26 Índice somático (riñón) y comparación entre lotes experimentales

La letra a indica diferencias significativas con respecto al grupo Control y la b, con respecto al grupo Inicial.

En el grupo Control las ratas muestran un riñón con estructura aparentemente normal caracterizada por un glomérulo de grandes dimensiones, túmulos aparentemente normales sin presentar luces en los túmulos contorneados proximales pero sí en los distales (Figura 27 A).

Las ratas de los lotes tratados muestran en riñón procesos de glomerulopatía con tubulonefrosis generalizada que termina en procesos de atrofia glomerular.

En el grupo Frito II (26,5% CP), las ratas presentan en el glomérulo una fuerte vacuolización a nivel de la cápsula de Bowman y

arrugamiento de los capilares. Los túmulos proximales y distales presentan luces.

La cápsula de Bowman aparece replegada con pérdida parcial de luces y núcleos picnóticos dando imagen de glomérulos atróficos (Figura 27 C).

En el grupo Frito III (33,6% CP) se acentúan todos estos procesos y se destaca una glomerulopatía con pérdida del espacio de Bowman, repliegue de los capilares y las células mesangiales como podocitos con núcleos picnóticos dando una imagen de atrofia glomerular. También se aprecia blomerulonefrosis (Figura 27 C).

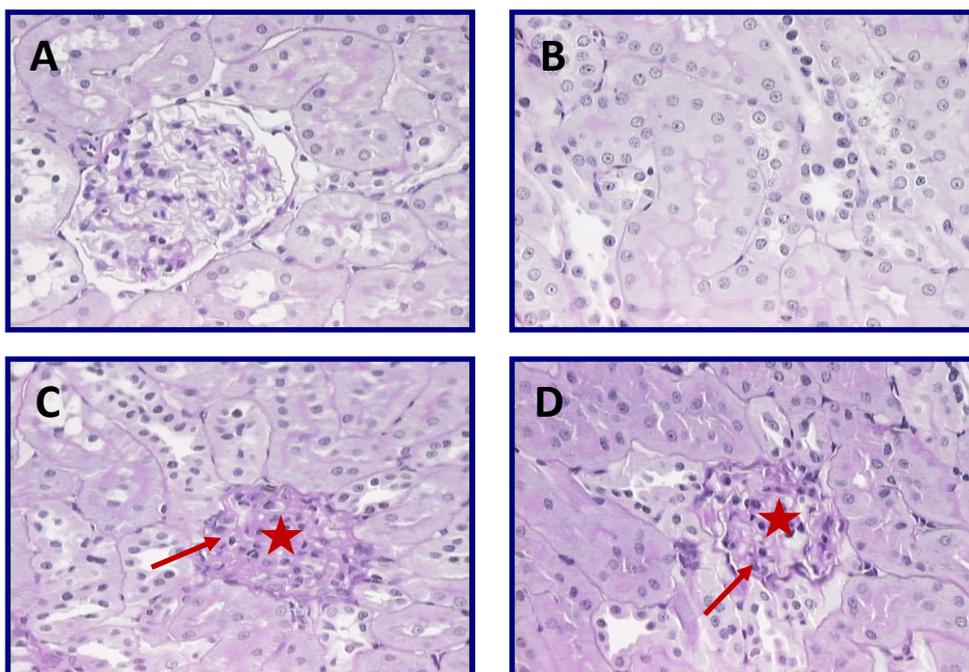


Figura 27 Alteraciones del tejido renal (microscopio óptico)

Ratas expuestas de forma subcrónica a dietas elaboradas con aceite sometido a diversos grados de fritura. Microscopio óptico (tinción hematoxilina-eosina). (A) Grupo Control: estructura normal. Glomérulo grande y túmulos normales. (B) Lote

Frito I (12,5% CP). (C) Lote Frito II (26,5% CP): cápsula de Bowman replegada (flechas) y núcleos picnóticos (estrella). (D) Lote Frito III (33,6% CP): pérdida del espacio de Bowman (flecha) y núcleos picnóticos (estrella).

HIGADO:

Se representa el peso del hígado en comparación con los distintos grupos experimentales. No se encuentran diferencias significativas entre los distintos tipos de tratamientos.

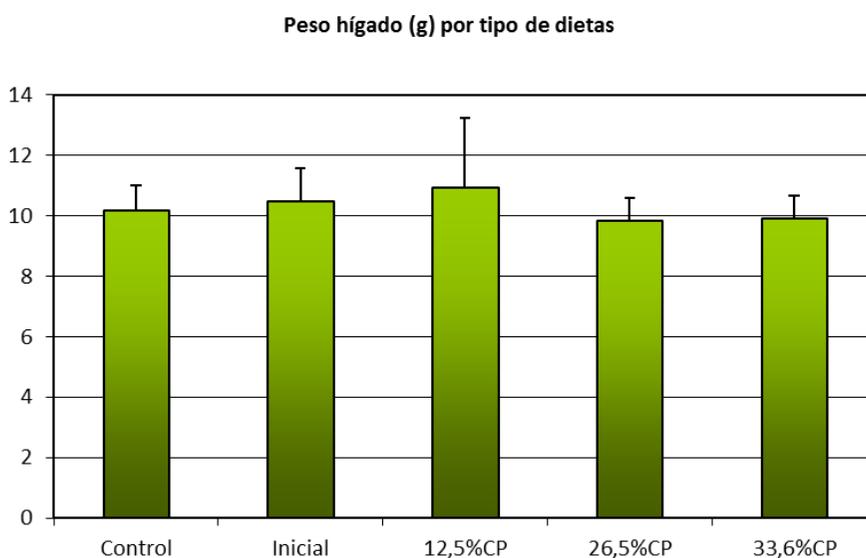


Figura 28 Peso del hígado en los distintos grupos experimentales

El índice hepatosomático tampoco varía en ninguno de los lotes tratados ni con respecto al lote Control ni con respecto al grupo Inicial (Figura 29):

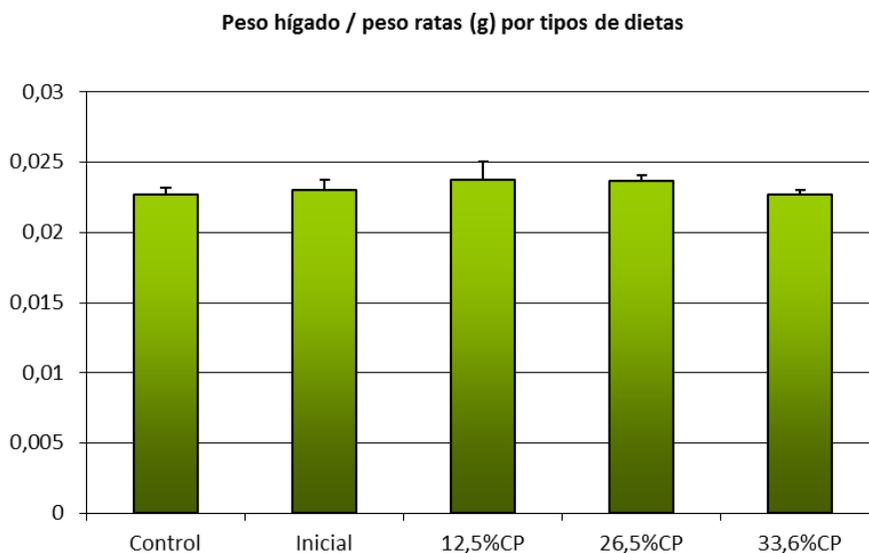


Figura 29 Índice hepatosomático en los distintos grupos experimentales

La estructura hepática del grupo Control es aparentemente normal frente a la de los lotes tratados que muestran ligeras alteraciones, siendo este órgano el menos afectado de los estudiados (Figura 30A). En los lotes tratados con aceites de fritura, se aprecia una suave esteatosis multilocular y ligera hepatitis parenquimatosa, que se acentúa en la fase final como esteatosis intersticial.

En el hígado de las ratas del lote Frito I (Figura 30B) se observan los cordones hepáticos normales y pequeñas infiltraciones a modo de ligera hepatitis parenquimatosa, mientras que en el lote Frito II (Figura 30C) los hepatocitos se muestran tumefactos, pero aún también mantienen la estructura de cordones y sólo se detecta esteatosis multilocular. Por último en el lote Frito III, además de la

esteatosis se puede apreciar una fuerte infiltración, sobre todo en los intersticios (Figura 30D).

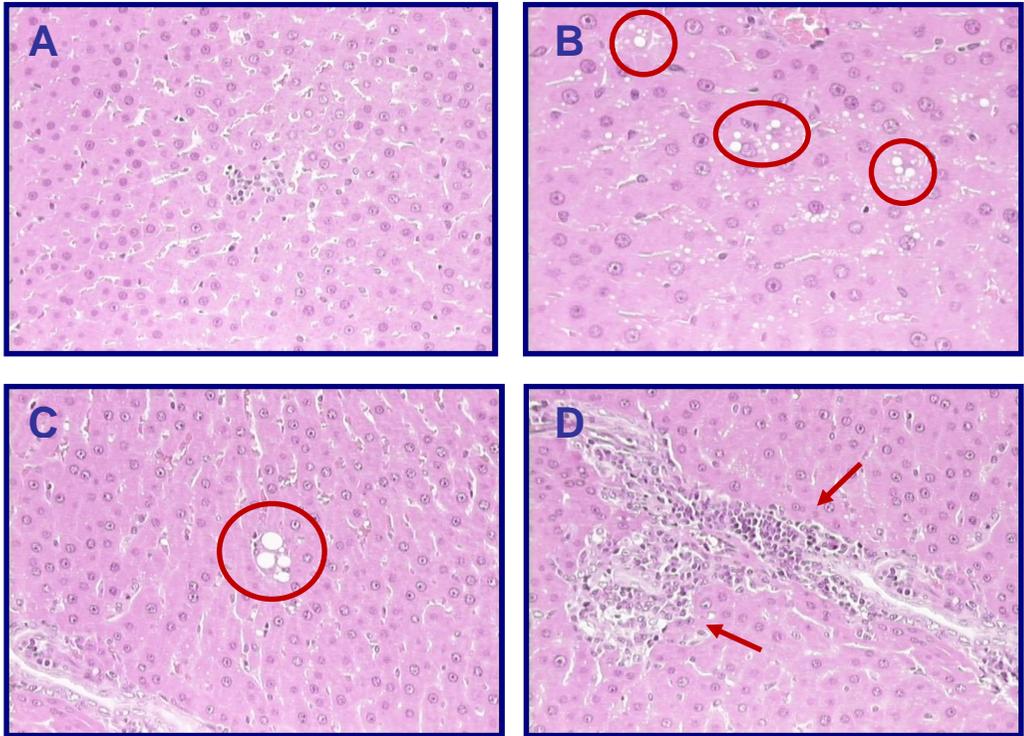


Figura 30 Alteraciones del tejido hepático (microscopio óptico)

Ratas expuestas de forma subcrónica a dietas elaboradas con aceite sometido a diversos grados de fritura. Microscopio óptico (tinción hematoxilina-eosina). (A) Grupo Control: cordones hepáticos normales. (B) Lote Frito I (12,5% CP). (C) Lote Frito II (26,5% CP). (D) Lote Frito III (33,6% CP). Esteatosis multilocular (círculos), que se acentúa en la fase final como esteatosis intersticial (flechas)

4.3. DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS

4.3.1. Órganos

CORAZÓN:

* Medida de la LPO:

Con respecto a los grupos Control e Inicial, se aprecia un aumento significativo de la peroxidación lipídica en todos los lotes tratados con los aceites sometidos a los distintos grados de fritura (Figura 31).

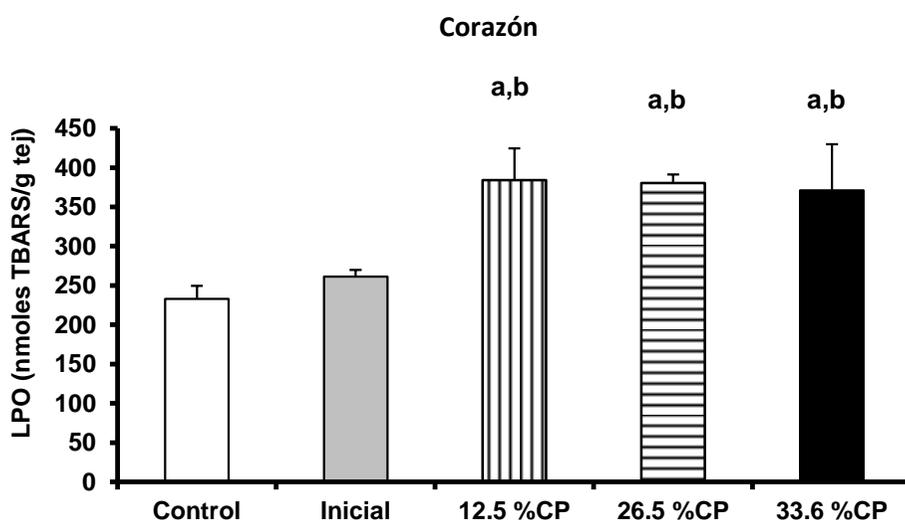


Figura 31 Peroxidación lipídica en corazón (expresada en nmoles/g)

Tejido en corazón de ratas expuestas de forma subcrónica a una dieta elaborada con aceite sometido a diversos grados de fritura. Los niveles de significación ($p < 0,05$) observados fueron (a) con respecto al grupo Control y (b) respecto al grupo Inicial.

* Medida de la actividad de las enzimas antioxidantes: SOD, CAT, GPx y GR:

En cuanto a la actividad superóxido dismutasa (Figura 32), no se encontraron diferencias significativas entre los distintos grupos.

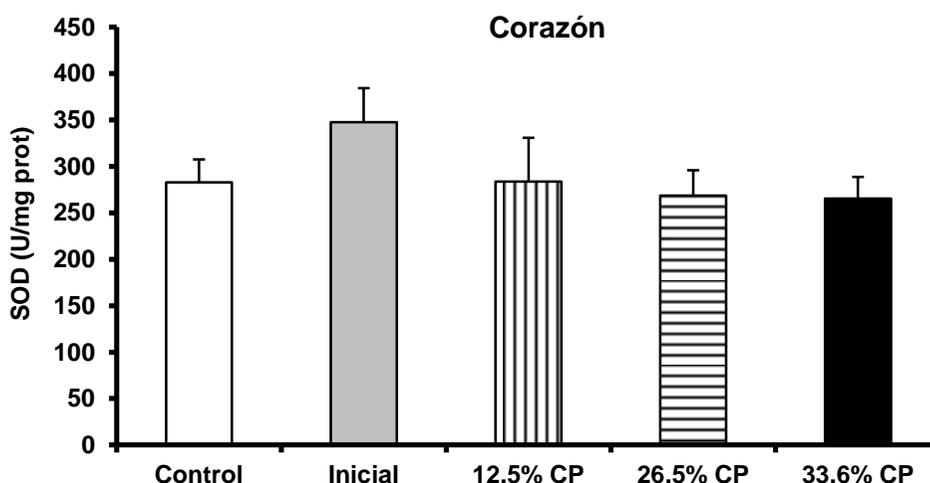


Figura 32 Actividad SOD en corazón (expresada en U/mg proteína).

Corazón de ratas expuestas de forma subcrónica a una dieta elaborada con aceite sometido a diversos grados de fritura. No se observaron diferencias significativas entre los distintos grupos

En la actividad catalasa (Figura 33), se observó un aumento significativo en los lotes Frito II y Frito III (con un 26.5% y 33,6% de compuestos polares respectivamente). En ambos grupos, la actividad fue mayor en comparación con los grupos Control e Inicial.

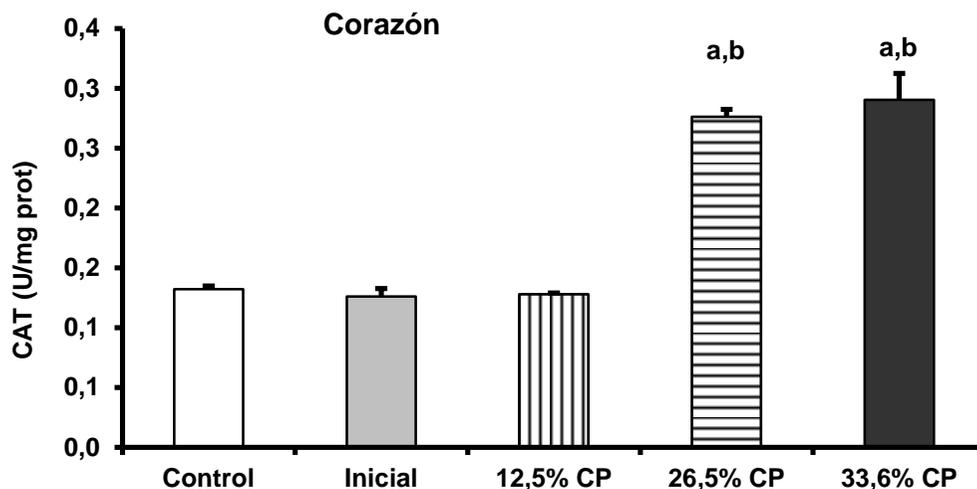


Figura 33 Actividad CAT en corazón (expresada en U/mg proteína).

Corazón de ratas expuestas de forma subcrónica a una dieta elaborada con aceite sometido a diversos grados de fritura. Los niveles de significación ($p < 0,05$) observados fueron (a) con respecto al grupo Control y (b) respecto al grupo Inicial

En cuanto a la GPx (Figura 34), todos los lotes tratados con aceites conteniendo distintos niveles de compuestos polares experimentaron una disminución significativa de esta actividad enzimática en comparación con los grupos Control e Inicial.

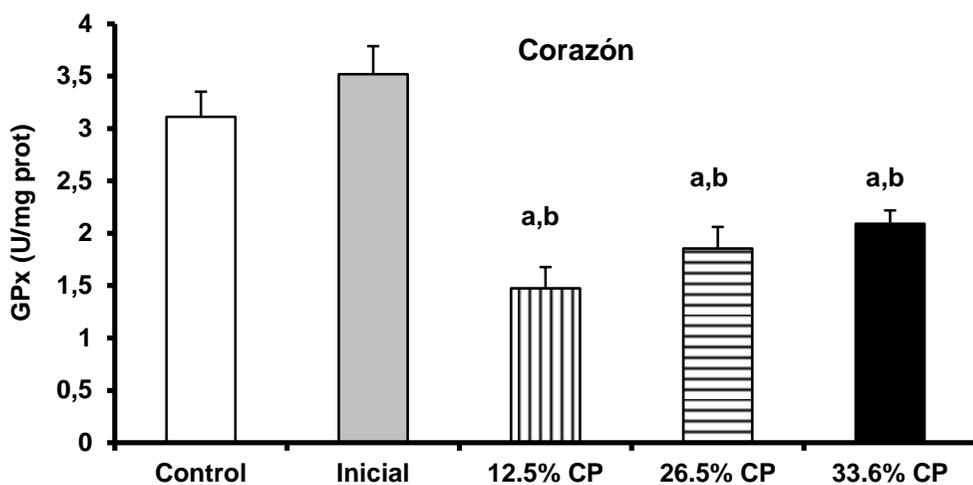


Figura 34 Actividad GPx en corazón (expresada en U/mg proteína)

Corazón de ratas expuestas de forma subcrónica a una dieta elaborada con aceite sometido a diversos grados de fritura. Los niveles de significación ($p < 0,05$) observados fueron (a) con respecto al grupo Control y (b) respecto al grupo Inicial

Por último, en la actividad GR (Figura 35), no se observaron cambios significativos en ninguno de los lotes experimentales.

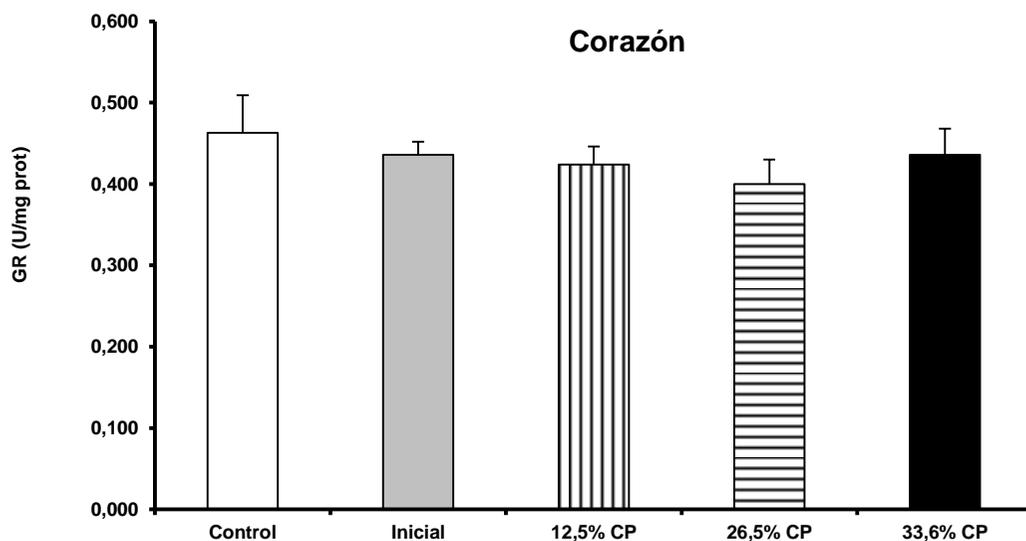


Figura 35 Actividad GR en corazón (expresada en U/mg proteína)

Ratas expuestas de forma subcrónica a una dieta elaborada con aceite sometido a diversos grados de fritura. No se observaron diferencias significativas entre los distintos grupos.

RIÑÓN:

* *Medida de la LPO:*

Con respecto a los grupos Control e Inicial, se apreció un aumento significativo de la peroxidación lipídica en los grupos tratados con los aceites fritos (Figura 36).

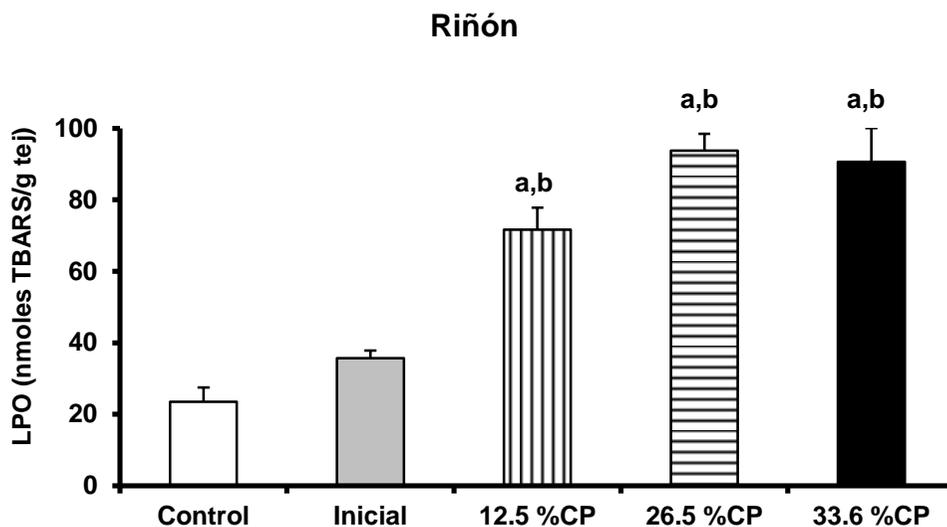


Figura 36 Peroxidación lipídica (LPO) en riñón (expresada en nmol/g tejido).

Riñón de ratas expuestas de forma subcrónica a una dieta elaborada con aceite sometido a diversos grados de fritura. Los niveles de significación ($p < 0,05$) observados fueron (a) con respecto al grupo Control y (b) respecto al grupo Inicial.

* *Medida de la actividad de las enzimas antioxidantes: SOD, CAT, GPx y GR:*

En cuanto a la actividad SOD, no se observaron diferencias significativas entre los distintos grupos (Figura 37).

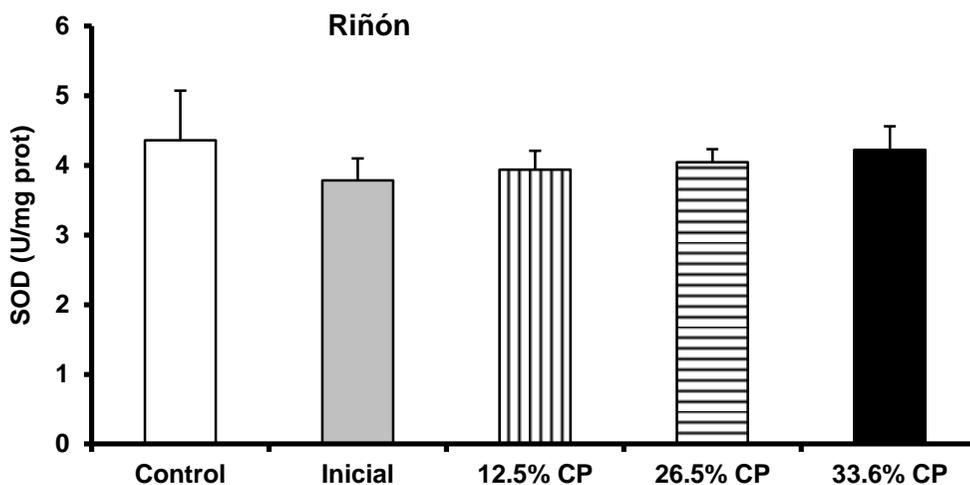


Figura 37 Actividad SOD en riñón (expresada en U/mg proteína)

Riñón de ratas expuestas de forma subcrónica a una dieta elaborada con aceite sometido a diversos grados de fritura. No se observaron diferencias significativas entre los distintos grupos

En la actividad CAT (Figura 38), los cambios se observaron en los dos últimos lotes tratados (Frito II y Frito III; con un 26,5 y 33,6% de compuestos polares respectivamente). Se observa una disminución de la actividad enzimática. En el lote Frito II, las diferencias fueron sólo con respecto al grupo Control, mientras que en el lote Frito III, las divergencias fueron frente a los grupos Control e Inicial.

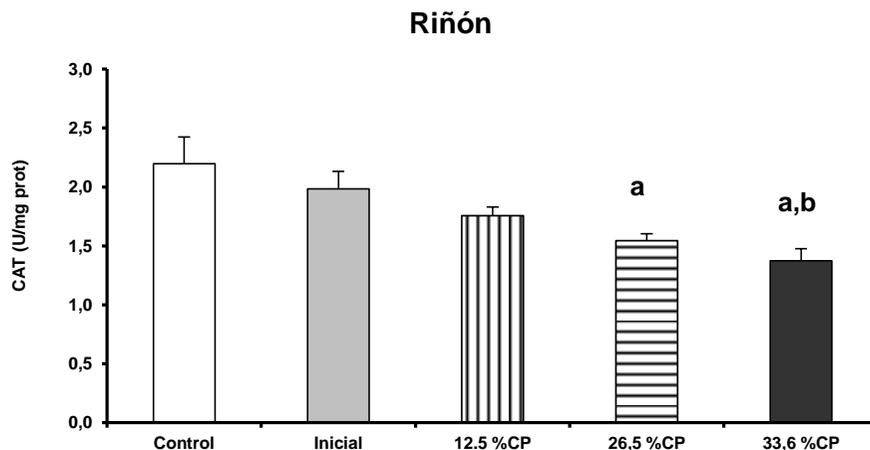


Figura 38 Actividad CAT en riñón (expresada en U/mg proteína).

Riñón de ratas expuestas de forma subcrónica a una dieta elaborada con aceite sometido a diversos grados de fritura. Los niveles de significación ($p < 0,05$) observados fueron (a) con respecto al grupo Control y (b) respecto al grupo Inicial.

De forma similar, la actividad GPx experimentó una reducción significativa en los grupos con un 26,5% y 33,6% de compuestos polares en sus dietas (Figura 39).

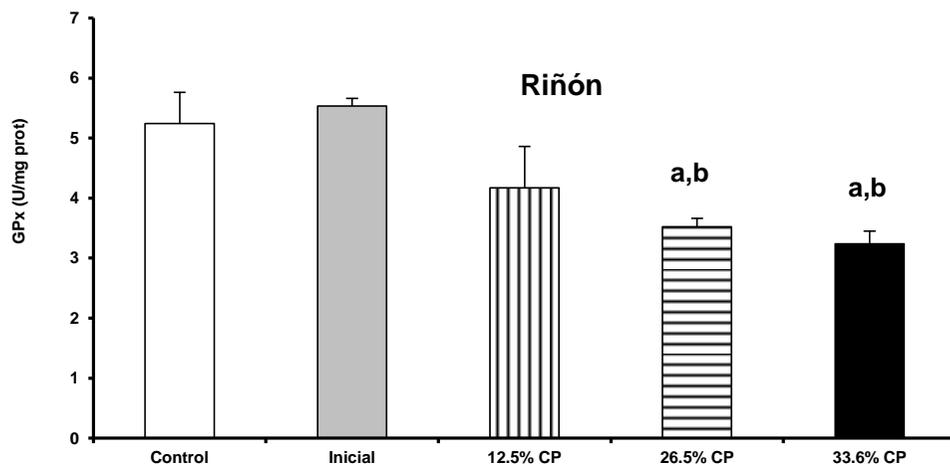


Figura 39 Actividad GPx en riñón (expresada en U/mg proteína).

Riñón de ratas expuestas de forma subcrónica a una dieta elaborada con aceite sometido a diversos grados de fritura. Los niveles de significación ($p < 0,05$) observados fueron (a) con respecto al grupo Control y (b) respecto al grupo Inicial

En la actividad GR, no se produjeron cambios significativos (Figura 40).

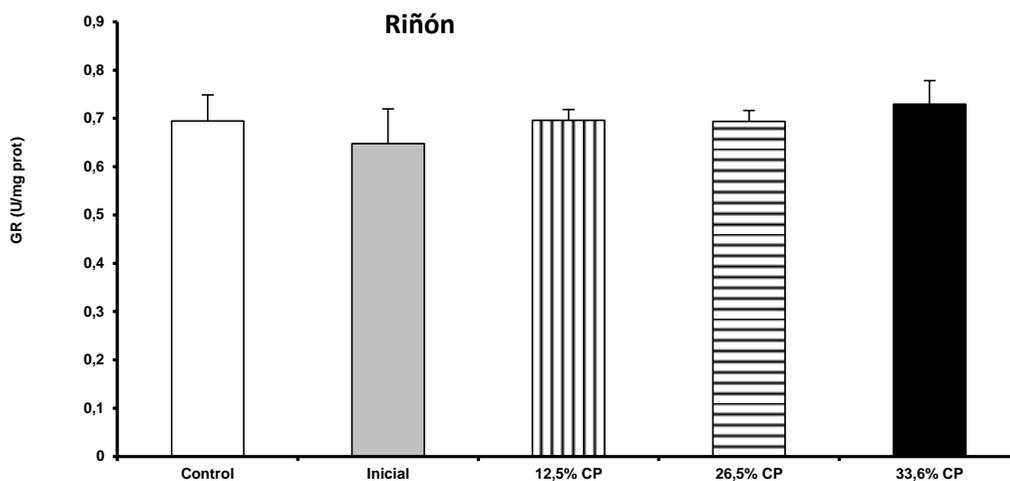


Figura 40 Actividad GR en riñón (expresada en U/mg proteína)

Riñón de ratas expuestas de forma subcrónica a una dieta elaborada con aceite sometido a diversos grados de fritura. No se observaron diferencias significativas entre los distintos grupos.

HIGADO:

** Medida de la LPO:*

En este órgano, los niveles de LPO (Figura 41) no muestran cambios significativos en las ratas tratadas con un 12,5% y 26,5% de compuestos polares. Sin embargo, en aquellas que recibieron una dieta con un 33,6% de compuestos polares, se observó un aumento significativo de este parámetro en comparación con respecto al lote Control y al Inicial.

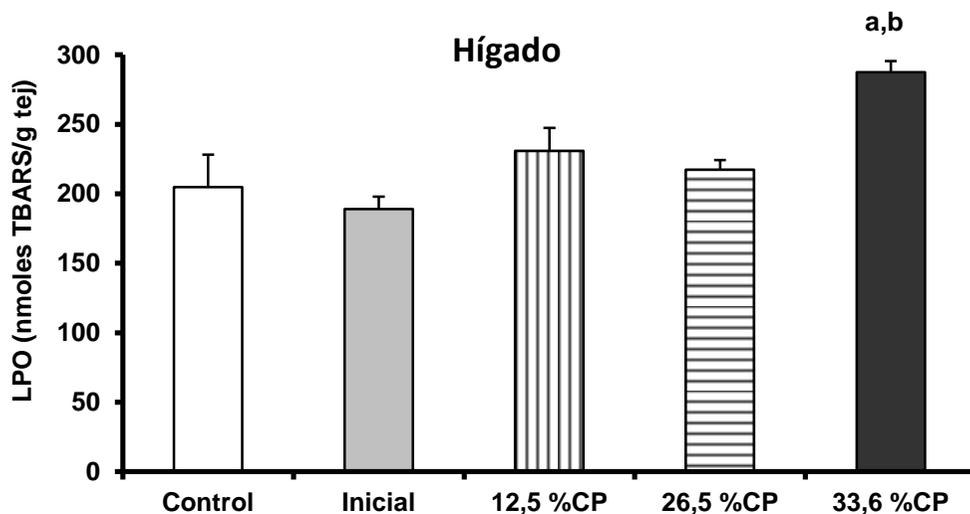


Figura 41 Peroxidación lipídica en hígado (expresada en nmoles/g tejido)

Hígado de ratas expuestas de forma subcrónica a una dieta elaborada con aceite sometido a diversos grados de fritura. Los niveles de significación ($p < 0,05$) observados fueron (a) con respecto al grupo Control y (b) respecto al grupo Inicial.

* Medida de la actividad de las enzimas antioxidantes: SOD, CAT, GPx y GR:

En cuanto a la actividad SOD (Figura 42), no se observan cambios significativos entre los diferentes grupos experimentales.

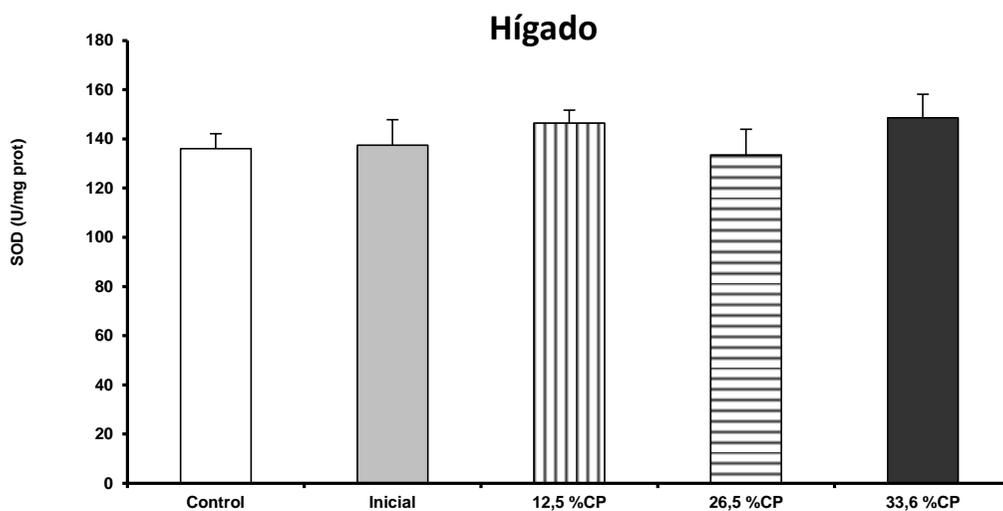


Figura 42 Actividad SOD en hígado (expresada en U/mg proteína).

Hígado de ratas expuestas de forma subcrónica a una dieta elaborada con aceite sometido a diversos grados de fritura. No se observaron diferencias significativas entre los distintos grupos.

En las actividades CAT (

Figura 43), GPx (Figura 44) y GR (

Figura 45), tampoco se produjeron cambios significativos en los distintos lotes tratados.

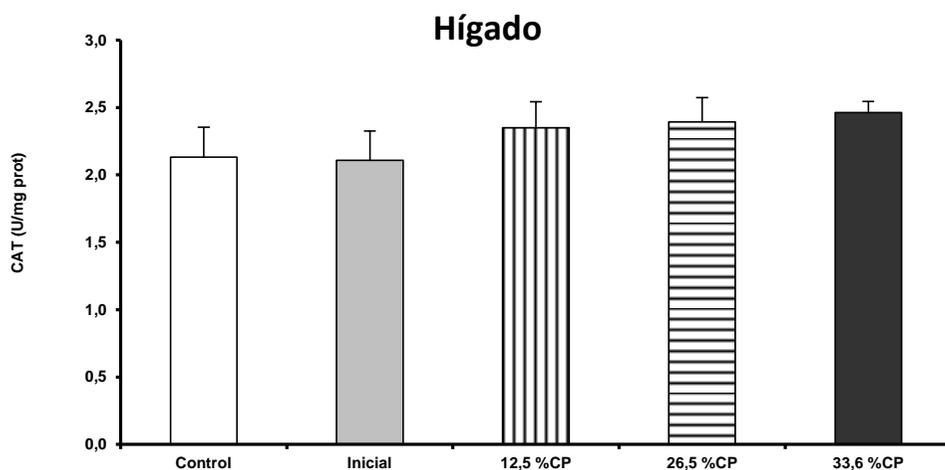


Figura 43 Actividad CAT en hígado (expresada en U/mg proteína)

Hígado de ratas expuestas de forma subcrónica a una dieta elaborada con aceite sometido a diversos grados de fritura. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales

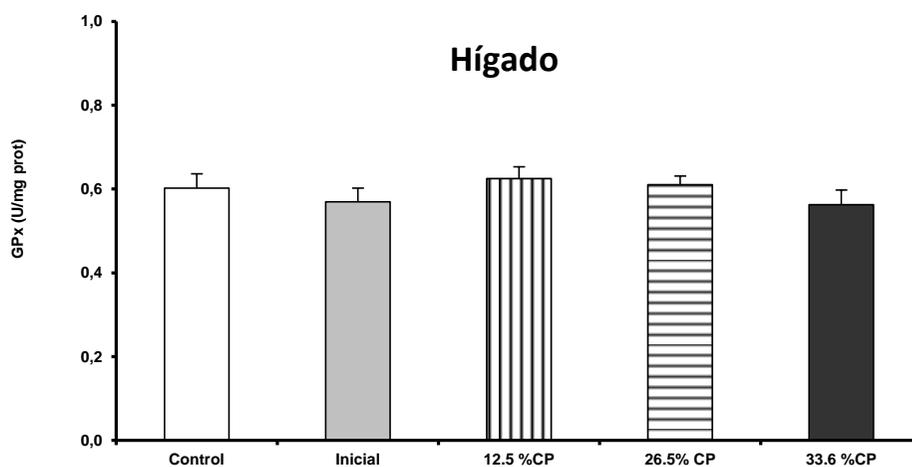


Figura 44 Actividad GPx en hígado (expresada en U/mg proteína).

Hígado de ratas expuestas de forma subcrónica a una dieta elaborada con aceite sometido a diversos grados de fritura. No se observaron diferencias significativas entre los distintos grupos.

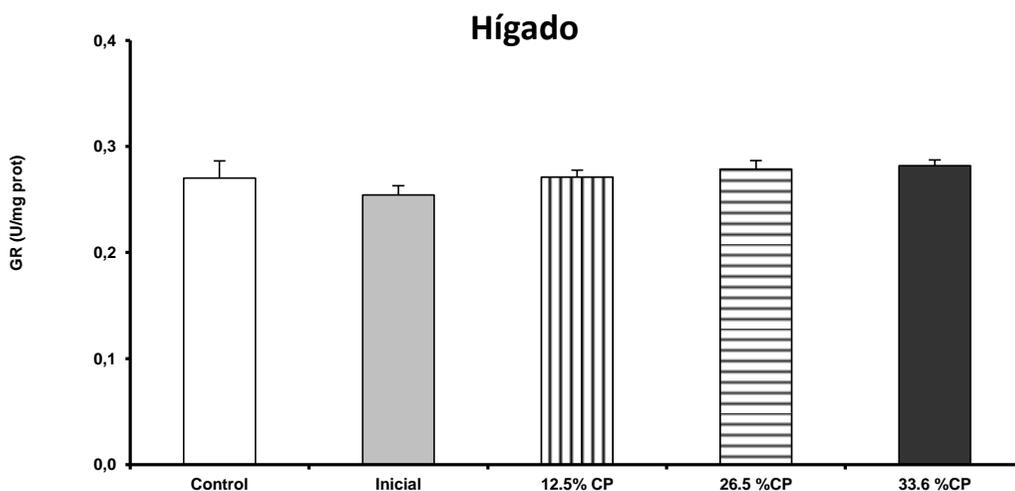


Figura 45 Actividad GR en hígado (expresada en U/mg proteína).

Hígado de ratas expuestas de forma subcrónica a una dieta elaborada con aceite sometido a diversos grados de fritura. No se observaron diferencias significativas entre los diferentes lotes experimentales

4.3.2. Sangre

** Medida de la LPO en plasma:*

Las medidas obtenidas en plasma (Figura 46) indican que se produjo un aumento significativo de la peroxidación lipídica en los grupos alimentados con las dietas Frito II y Frito III (con un 26,5% y 33,6% de compuestos polares respectivamente), siendo estas diferencias significativas respecto al Control.

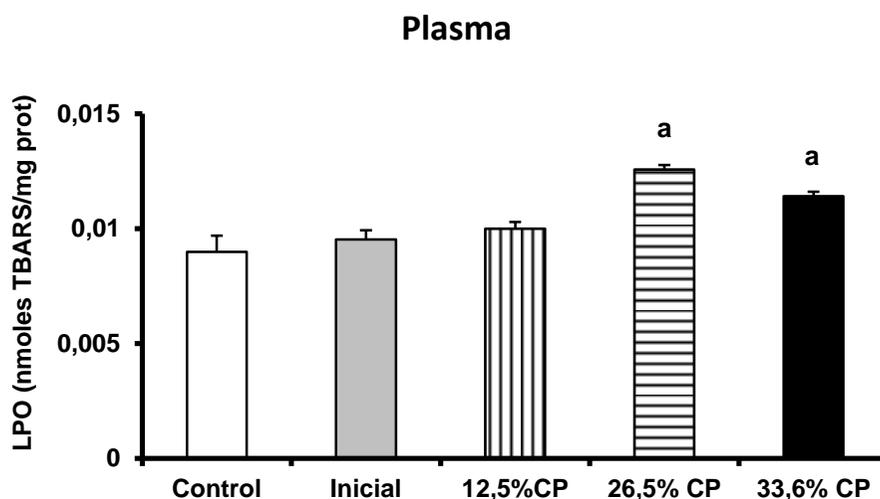


Figura 46 Peroxidación lipídica en plasma (expresada en nmoles/mg de proteína).

Plasma de ratas expuestas de forma subcrónica a una dieta elaborada con aceite sometido a diversos grados de fritura. Se encontraron diferencias significativas en los grupos Frito II y Frito III ($p < 0,05$) con respecto al Control

* Medida de la actividad de las enzimas antioxidantes: SOD, CAT, GPx y GR:

En la actividad SOD (Figura 47), se observaron cambios significativos en los lotes tratados con aceite de oliva virgen procedente de la fritura (12,5%, 26,5% y 33,6% de compuestos polares). Las diferencias son patentes respecto a los grupos Control e Inicial. Inicialmente, la actividad SOD experimentó un aumento en los lotes Frito I (12,5% CP) y Frito II (26,5% CP) para luego descender en el Frito III (33,6% CP).

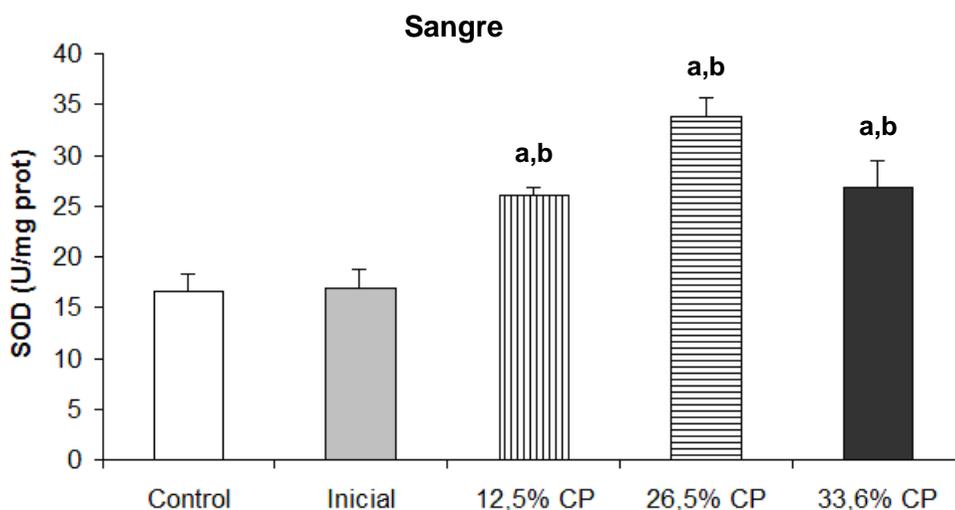


Figura 47 Actividad SOD en sangre (expresada en U/mg proteína).

Sangre de ratas expuestas de forma subcrónica a una dieta elaborada con aceite sometido a diversos grados de fritura. Los niveles de significación ($p < 0,05$) observados fueron (a) con respecto al grupo Control y (b) respecto al grupo Inicial

La CAT (Figura 48) tiene su máxima actividad en el grupo con un 26,5% de compuestos polares en la dieta. Sigue prácticamente la misma progresión que la actividad SOD, con un máximo en Frito II, y a partir de ahí, decrece. Las diferencias se observan respecto a los grupos Control e Inicial.

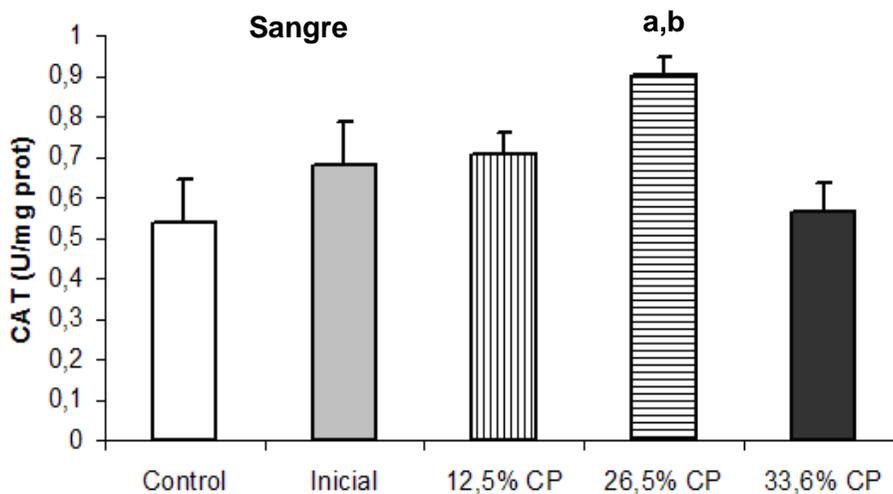


Figura 48 Actividad CAT en sangre (expresada en U/mg proteína).

Sangre de ratas expuestas de forma subcrónica a una dieta elaborada con aceite sometido a diversos grados de fritura. Los niveles de significación ($p < 0,05$) observados fueron (a) con respecto al grupo Control y (b) respecto al grupo Inicial

En la actividad GPx (

Figura 49) no se observaron diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales.

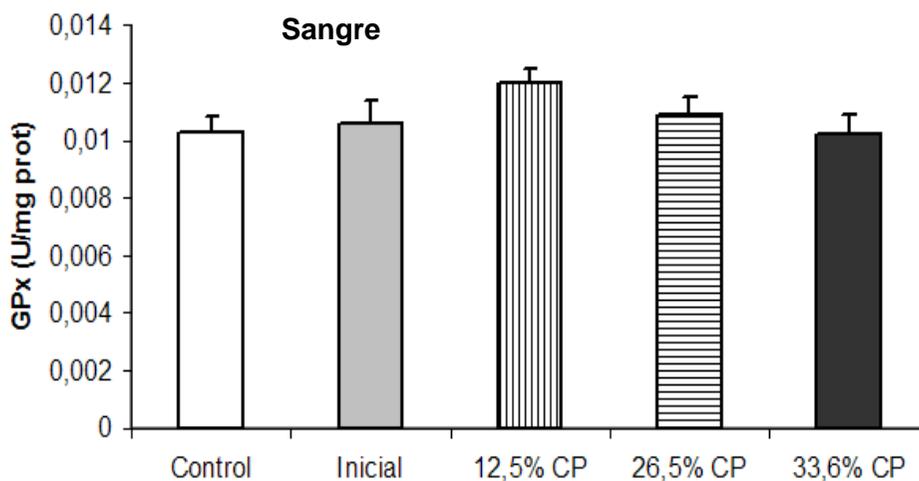


Figura 49 Actividad GPx en sangre (expresada en U/mg).

Proteína, en sangre de ratas expuestas de forma subcrónica a una dieta elaborada con aceite sometido a diversos grados de fritura. No se observaron diferencias significativas entre los diferentes lotes experimentales

En la actividad GR (Figura 50) tampoco se observaron diferencias significativas entre los distintos lotes.

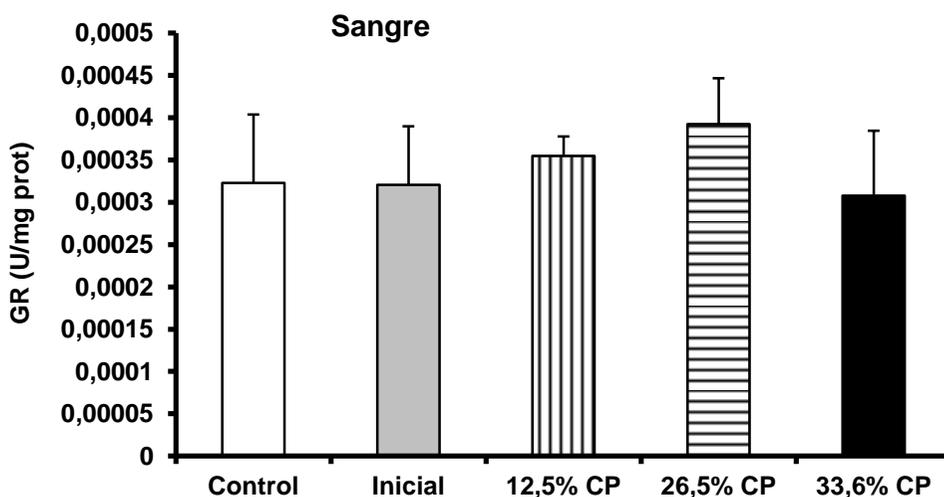


Figura 50 Actividad GR en sangre (expresada en U/mg).

Proteína, en sangre de ratas expuestas de forma subcrónica a una dieta elaborada con aceite sometido a diversos grados de fritura. No se observaron diferencias significativas entre los diferentes lotes experimentales

Paralelamente a las determinaciones anteriores, se llevó a cabo el estudio del perfil bioquímico del suero sanguíneo en los distintos lotes experimentales. Se evaluaron diferentes parámetros, en busca de datos que reforzasen los resultados previos. Estos son: glucosa, urea, creatinina, tiempo de protrombina (TP), albúmina, colesterol, triglicéridos, aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT), lipoproteínas de baja densidad (LDLP), fosfatasa alcalina (ALP-AMP), amilasas, creatina quinasa (CK-Nac), niveles de calcio, sodio, potasio, cloro, colina e inhibidor de proteasa (IP) o antitripsina.

En la Tabla 13 se muestra el resultado del análisis bioquímico en los distintos grupos experimentales. Las diferencias significativas se

indican con superíndices; siendo “a” diferencias con respecto al grupo Control y “b”, con respecto al Inicial.

Parámetros	Control	Inicial	12,5%CP	26,5%CP	33,6%CP
Glucosa	134,45 ± 38,09	205,05 ± 38,93	168,01 ± 17,20	159,05 ± 32,56	137,06 ± 14,01
Urea	32,58 ± 6,65	36,84 ± 5,89	34,79 ± 6,81	31,75 ± 3,48	29,54 ± 2,70
Creatinina	0,6 ± 0,00	0,77 ± 0,06	0,67 ± 0,06	0,65 ± 0,06	0,64 ± 0,05
UA	0,78 ± 0,11	1 ± 0,43	0,69 ± 0,09	0,43 ± 0,12	0,76 ± 0,08
TP	6,74 ± 0,66	6,78 ± 0,29	6,79 ± 0,43	6,47 ± 0,09	6,18 ± 0,25
Albúmina	4,16 ± 0,15	4,01 ± 0,21	4,12 ± 0,14	3,93 ± 0,08	3,77 ± 0,21
Triglicéridos	88,79 ± 7,71	141,86 ± 44,94	105,98 ± 4,75	64,70 ± 6,21 ^b	41,82 ± 5,81 ^b
Colesterol	53,94 ± 13,52	59,35 ± 8,07	73,14 ± 11,38	57,73 ± 18,64	75,22 ± 9,44
AST	71,50 ± 7,78	83,25 ± 3,86	87,25 ± 21,5	138,50 ± 20,68 ^{a,b}	120,00 ± 14,63 ^{a,b}
ALT	23,00 ± 4,24	27,00 ± 5,03	29,75 ± 4,11	41,00 ± 4,69	41,25 ± 7,63
LDLP	221,50 ± 17,68	671,50 ± 43,49	382,00 ± 149,32	385,50 ± 105,14 ^b	250,20 ± 83,22 ^b
ALP-AMP	133,50 ± 28,99	145,25 ± 13,45	174,00 ± 29,02	148,50 ± 41,36	136,80 ± 31,03
Amilasa	2897,50 ± 9,19	3163,75 ± 251,62	2727,25 ± 264,85	2920,00 ± 460,28	2459,00 ± 315,22
CK-Nac	212,00 ± 106,71	352,67 ± 105,21	321,25 ± 182,99	374,50 ± 142,42	253,40 ± 123,45
Calcio	10,04 ± 0,64	9,79 ± 0,17	9,13 ± 0,29	9,17 ± 0,17	8,82 ± 0,40
IP	4,63 ± 0,54	4,60 ± 1,37	4,40 ± 0,36	4,55 ± 0,68	4,63 ± 0,83
Colina	50,50 ± 20,98	123,00 ± 49,51	144,25 ± 22,11	118,33 ± 25,11	139,80 ± 112,04
Sodio	142,00 ± 0,82	138,50 ± 3,53	137,67 ± 4,93	141,25 ± 2,06	136,60 ± 11,33
Potasio	4,90 ± 1,30	5,40 ± 0,00	4,02 ± 0,95	4,7 ± 1,01	4,52 ± 0,63
Cloro	104,75 ± 1,89	103,50 ± 2,12	101,67 ± 3,51	104,00 ± 2,16	99,00 ± 7,97

Tabla 13 Análisis bioquímico en plasma de los distintos grupos experimentales

Al comparar entre los distintos tipos de dietas, los únicos parámetros que muestran diferencias significativas son: el perfil de triglicéridos, la AST y LDLP.

En cuanto a los triglicéridos, tanto el grupo Frito II como el Frito III, muestran una disminución significativa de los valores con respecto al grupo Inicial. AST aumenta significativamente en los mismos grupos, tanto con respecto al grupo Control como al Inicial. Por último, en los niveles de LDLP se observa un aumento significativo con respecto al grupo Inicial (en Frito II y Frito III).

5. DISCUSIÓN

Los efectos tóxicos derivados de la ingesta de aceites sometidos a diversos grados de fritura no han sido extensamente estudiados en la literatura científica y los resultados encontrados son divergentes (Marquez-Ruiz y Dobarganes, 2006). No obstante, hay que admitir que cada vez hay mayor preocupación por desarrollar unos hábitos de vida saludables y esto incluye, como no puede ser de otro modo, a la dieta.

Se sabe que la dieta tiene un efecto directo sobre algunas patologías. La hipertensión, por ejemplo, es un problema bastante generalizado en países desarrollados. En España, la prevalencia de esta enfermedad en adultos es de aproximadamente el 45%. Aunque el desarrollo de esta enfermedad varía significativamente según la edad, el sexo o la conformación física del individuo, lo cierto es que la dieta tiene también un papel importante. Hay autores (Soriguer y col., 2003) que han demostrado una correlación positiva entre la ingesta de alimentos fritos, en el ámbito doméstico, y la incidencia de presión arterial elevada.

En relación al consumo de alimento, y en contra de lo establecido en la bibliografía (Beynen y col., 1999; Martinez y col., 2001), las dietas suplementadas con un 12% de aceite no parecen ser más gratas al paladar que la dieta Control.

Varios autores (Clark y col., 1991; López-Varela y col., 1995) sugieren que las dietas ricas en grasas de fritura, son menos aceptadas por los modelos experimentales; no tanto por los polímeros generados durante el proceso de fritura, sino por los compuestos oxidados que se forman. De igual modo, hay quien fija este nivel de tolerancia en un 30% de compuestos polares, ya que es en este punto, cuando el olor y el sabor de los aceites son inaceptables (Billek y col., 1985). Al igual que en el estudio realizado por López-Varela y col. (1995), en nuestros

aceites, la generación de compuestos oxidados en el proceso de fritura es proporcionalmente mayor a la cantidad de polímeros de glicéridos formados, y como los primeros son los responsables de la palatabilidad de las dietas, esto explicaría por qué las dietas Frito I, Frito II y Frito III (con un 12,5%, 26,5% y 33,6% de compuestos polares respectivamente) sean menos aceptadas.

En el presente estudio, en todos los lotes experimentales, el aumento de peso sigue una progresión ascendente a lo largo del tiempo.

Respecto a la ganancia de peso por tipo de dieta, el grupo Control se mantiene muy próximo a los grupos Inicial y Frito I. En contra de lo esperado, no se encuentran diferencias significativas entre los grupos Control (con un 5% de aceite como base de la dieta) e Inicial (suplementado con un 12% de aceite sin tratamiento). A medida que el aceite se va contaminando con los productos de degradación, la ganancia de peso va disminuyendo, hasta que alcanza un mínimo en el grupo Frito III (con un 33,6% CPs). Hay autores (Hemans y col., 1973; Rodríguez y col., 1984; López-Varela, 1995; Garrido-Polonio y col., 2004) que encontraron una menor ganancia de peso en aquellos grupos que recibieron una dieta a base de aceite de fritura. Por otro lado, hay trabajos (Alharbi y col., 1993; Pérez-Granados y col., 1999) donde no se puede establecer una relación entre los efectos negativos de los compuestos polares en la dieta y la ganancia de peso de los individuos. En este sentido, en la bibliografía hay datos muy diversos; incluso estudios en los que el peso se incrementa en aquellos animales con una dieta elevada en compuestos polares (Lanteaume y col., 1968). No obstante, son varios los parámetros que difieren entre unos estudios y otros, como son el tipo de aceite utilizado, el tiempo de exposición de las ratas al tóxico y la proporción de grasas suministrada en la dieta, por lo que es difícil establecer comparaciones.

En cuanto a la eficiencia de conversión de la ingesta, los resultados encontrados son divergentes. Hay autores (López-Varela, 1997; Narasimhamurthy, 1999) que respecto a este parámetro, no

encuentran una variación significativa entre los distintos grupos experimentales; siendo este nuestro caso. Sin embargo, otros autores (Garrido-Polonio, 2004) encontraron una disminución de la eficiencia de conversión de la ingesta en aquellos grupos experimentales alimentados con dietas con un 27% de compuestos polares. Estos autores atribuyen la disminución en este índice, a los productos de degradación que se forman en el aceite durante el proceso de fritura.

Si analizamos en conjunto las variables: aumento de peso, consumo de alimento, ganancia de peso corporal y eficiencia de la ingesta, los datos reflejan que el aumento de peso es similar en los distintos grupos experimentales, excepto en el Frito III en el cual, es significativamente menor. Esto coincide con el hecho de que la ingesta de alimento es inferior en este grupo. Debido a que la eficiencia de conversión de la ingesta no varía significativamente entre los lotes experimentales, asumimos que en la medida en que las ratas se alimentan, así revertirá su efecto en la ganancia de peso; independientemente del nivel de compuestos polares de las dietas.

Hay multitud de trabajos que relacionan el estrés oxidativo con el desarrollo de enfermedades crónicas; ya sean a nivel cardiovascular, del sistema digestivo o incluso el cáncer (Grootveld y col., 1998; Hallwell y col., 1999; Zorrilla y col., 2002; Soriguer y col., 2003, Manoj y col., 2006). Los aceites, cuando son sometidos al proceso de fritura, generan con el tiempo una cantidad de compuestos tóxicos (compuestos polares) susceptibles de originar dicho daño oxidativo. A mayor grado de insaturación del aceite, más susceptibles son de oxidarse y mayor es el daño potencial que se puede originar. Como estos compuestos producidos por la oxidación térmica de los PUFAs pueden ser rápidamente absorbidos desde el intestino y dirigidos al resto del organismo por la circulación sistémica *in vivo* (Grootveld y col., 1998), sus efectos pueden manifestarse en cualquier tejido. Que el daño sea más o menos grave va a depender de aspectos tales como: el tipo de aceite considerado, de las características del proceso de fritura al que ha sido sometido, o de la dosis suministrada, entre otros.

Así por ejemplo, hay estudios (López-Varela y col., 1995; Pérez-Granados y col., 1999; Ruiz-Gutierrez y col., 1999; Kok y col., 1994; Fang y col., 1996) que ensayan distintas dosis comparando aceite de oliva con girasol, o aceite de palma, llegando a la conclusión de que aquellas grasas más ricas en ácidos grasos susceptibles de oxidarse (aquellos con mayor grado de insaturaciones) son los que producen efectos más severos en los organismos (en cuanto a ataques radicalarios se refiere). Otros autores sugieren incluso que el sistema de defensa antioxidante puede verse influenciado por la nutrición (Huang y col., 1994).

El aceite de oliva, es una grasa vegetal rica en ácidos grasos monoinsaturados y desde hace tiempo se relaciona con la salud cardiovascular (sin tener en cuenta otros beneficios que confiere al organismo). Como tal, es menos susceptible a la oxidación que otros aceites comerciales (precisamente por su nivel de ácidos grasos monoinsaturados), pero por otra parte, presenta en su composición otras sustancias (esteroles y polifenoles) con capacidad antioxidante y que contribuyen a sus efectos beneficiosos (Papadopoulus y col., 1991).

En relación con la cantidad de ácidos grasos mono o poliinsaturados y la dieta, hay autores (Quiles y col., 2004) que demuestran que el consumo de una grasa en particular, dentro de la dieta, afecta de manera directa el perfil de ácidos grasos y de sustancias antioxidantes del organismo y, de una manera indirecta, la susceptibilidad del organismo frente a la oxidación. Según la teoría de radicales libres (Hamon, 1956), el envejecimiento es el resultado del daño oxidativo al que se somete al organismo a lo largo de su vida. Otros autores (Ochoa y col., 2003) sugieren que el tipo de grasa que se incluye en la dieta debería ser un punto importante a considerar en estudios de envejecimiento, ya que el estrés oxidativo se encuentra directamente influenciado por este factor. En un estudio que llevaron a cabo con 80 ratas, concluyeron que el grado de insaturación de los lípidos de membrana se correlacionaba positivamente con una mayor

longevidad. Estudios similares (Binkoski y col., 2005) muestran la importancia de llevar una dieta equilibrada en MUFAs y PUFAs.

En el estudio clínico de Soriguer y col. (2003), concluyeron que el riesgo de hipertensión era inversamente proporcional a la concentración en sangre de ácidos grasos monoinsaturados.

No obstante, la importancia de un aceite y lo que le hace óptimo para fritura, no es sólo su composición en ácidos grasos, sino que es igualmente relevante el perfil de la fracción insaponificable. Ochoa y col. (2002) demostraron que en el aceite de fritura es tan importante la proporción ácido oleico:ácido linoleico como el presentar una cantidad de compuestos fenólicos tal que permita desarrollar una apropiada respuesta antioxidante. El estudio lo realizaron con conejos alimentados durante ocho semanas con dietas enriquecidas con distintos aceites de fritura. Estos aceites eran equivalentes en cuanto a cantidad de oleico se refiere, pero presentaban distinto perfil en la fracción insaponificable. Por medidas de peroxidación lipídica en plasma y perfil de ácidos grasos, concluyeron que cuando alguno de estos dos factores se modificaba, se producía un efecto negativo sobre la salud en los animales de experimentación.

Hay autores (Lee y col., 2002; Perona y col., 2005; Orozco-Solano y col., 2011) que sugieren la inclusión de determinados agentes antioxidantes en el aceite de fritura –tales como los presentes en el aceite de orujo de oliva o en los extractos de espinacas o ginseng- para potenciar su estabilidad.

Los órganos más afectados en el presente estudio, se corresponden con los del sistema cardiovascular. A nivel histológico, la degeneración del tejido se hace patente a medida que aumenta la cantidad de compuestos polares en la dieta, hasta que en la fase final, se muestra desorganización del material, zonas necróticas, alteración nuclear, etc. Resultados similares se encontraron en ratas alimentadas durante 28 días con una dieta de aceite de soja sometido a fritura. A

pesar de que el tiempo de exposición fue menor, una posible explicación a los efectos encontrados en el experimento anterior puede ser la cantidad de ácidos grasos poliinsaturados que tiene el aceite de soja (57%) con respecto al aceite de oliva (5%), aunque éste último presenta mayor cantidad de monoinsaturados (un 85% frente al 29% del aceite de soja).

El daño oxidativo ocurre a nivel de todos los componentes celulares (ácidos nucleicos, lípidos, proteínas), pero quizás es en las membranas celulares donde parece mayor el efecto. La importancia de los ácidos grasos de la dieta es tal, que influye en la composición de las membranas celulares e incide en la mayor o menor susceptibilidad al estrés oxidativo de las mismas (Battino y col., 1999).

En corazón, el índice somático no varía. Aunque la variación en el índice sugiere daño a nivel histológico, el que no se dé a la inversa, no significa que no exista daño (en este caso, las alteraciones sufridas no implican aumento o disminución en el peso del órgano). La aorta es la única muestra donde se observan cambios en el peso y en el índice somático, si comparamos entre los distintos grupos experimentales. Estos cambios son significativos precisamente en aquellos grupos con mayor cantidad de compuestos polares (Frito II y Frito III). Estas diferencias se manifiestan únicamente con respecto al grupo Inicial.

En cuanto al nivel de peroxidación lipídica en corazón, medida directa del estado de alteración de las membranas, las variaciones con respecto al grupo Control son evidentes y se relaciona con las aberraciones observadas a nivel celular e histológico. En el caso de los lípidos, la oxidación se trata de una reacción en cadena o autocatalítica, es decir, que una vez comenzada continúa desarrollándose por sí misma, con lo cual, los efectos, pueden ser mayores.

En principio era de esperar un efecto protector del aceite de oliva virgen extra (lote Inicial) con respecto al Control, por todas las propiedades beneficiosas ya comentadas que éste posee, pero los

resultados obtenidos no muestran cambios significativos en este sentido. Quizá el periodo de exposición (3 meses) o el nivel de suplementación de aceite (12%) no han sido suficientes.

En la actividad catalasa de corazón se observó un aumento en los lotes con un 26,5% (Frito II) y 33,6% (Frito III) de compuestos polares. Esta diferencia es evidente con respecto a los grupos Control e Inicial. En SOD y GR no se observaron cambios. Por otro lado, también se observan cambios significativos en los tres lotes tratados (Fritos I, II y III) con respecto a los grupos Control e Inicial en la actividad GPx, pero esta vez el efecto observado fue una disminución en la actividad de dicha enzima.

Los resultados obtenidos pueden dar una idea de cuáles son los sistemas de defensa que actúan en el corazón ante este tipo de daño tóxico. Mientras que la actividad catalasa parece activarse en aquellos lotes donde la cantidad de compuestos polares sobrepasa o ronda los niveles permitidos por la normativa, hay otros que no destacan (como es el caso de SOD o GR). Esto podría deberse a que la CAT es una de las primeras defensas con las que cuenta la célula para defenderse del estrés oxidativo y detoxicar las ERO. Por otro lado, el importante descenso observado en los niveles GPx puede ser debido a un exceso en los hidroperóxidos lipídicos a detoxicar por esta enzima, lo que ha llevado a la depleción de su actividad.

No en vano, y a la luz de los resultados obtenidos en el análisis de las preparaciones histológicas, parece que el sistema defensivo antioxidante no es capaz de frenar el efecto producido por los compuestos polares.

Hay estudios (Gupta y col., 2014) que indican que la alimentación con aceites de fritura a largo plazo, produce cambios a nivel estructural en la aorta de las ratas.

En riñón, el índice somático varía significativamente en los grupos experimentales Frito I y Frito III. En el primer grupo, las

diferencias son con respecto al grupo Control (disminuyendo en este caso) y en el grupo con un 33,6% CP, las diferencias son con respecto al grupo Inicial (aumentando en este otro). Los daños a nivel tisular no son tan drásticos como en corazón o en aorta; no obstante, los efectos son patentes a medida que aumenta la cantidad de compuestos polares en la dieta, hasta desencadenar en procesos de atrofia glomerular. Resultados similares fueron encontrados por Chanin y col. (1988), pero en este caso, se utilizó como base aceite de soja procedente de fritura.

En cuanto a los niveles de peroxidación lipídica, se aprecia un aumento significativo de los tres grupos tratados (Frito I, Frito II y Frito III) con respecto al Control y el Inicial. La razón que explicaría este fenómeno sería la misma que la expuesta para el corazón.

Respecto a la medida de la actividad de las enzimas antioxidantes, en SOD y GR no se observaron diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales. Sin embargo, en las actividades CAT y GPx, se produce una reducción significativa en los grupos con mayor cantidad de compuestos polares (Frito II y Frito III). Nuevamente, encontramos una pérdida de actividad enzimática, posiblemente debido a que la considerable cantidad de tóxico en el medio, afecta de alguna manera, a la capacidad de respuesta de las enzimas, mostrando CAT y GPx la mayor sensibilidad a estos tóxicos.

La respuesta del riñón ha sido similar a la encontrada en corazón, con alteraciones en la LPO y en las actividades GPx y CAT, con la diferencia de que esta última enzima aumentó su actividad en corazón, mientras que en riñón lo que se observó fue un descenso.

Los resultados mostrados a nivel histológico parecen apoyarse nuevamente en los resultados de las pruebas bioquímicas.

El presente estudio revela que el órgano menos afectado en cuanto a la actividad de las enzimas antioxidantes fue el hígado. A pesar de ello, se observa igualmente afectación a nivel histológico. Así,

el hecho de encontrar esteatosis, nos revela que dicho órgano está sometido a cierto nivel de estrés. El hígado es el órgano destoxicador por excelencia, por lo que la aparición de alteraciones a nivel de tejido, no resulta trivial. López-Varela y col. (1995) encontraron también lesiones en forma de áreas de fibrosis degenerativa moderada y un gran número de hepatocitos binucleados y eosinofílicos. Observaron además vacuolización severa e infiltración mononuclear.

El índice hepatosomático no se modificó significativamente entre los distintos grupos experimentales. En este sentido, multitud de estudios reflejan un leve aumento de la relación peso del hígado/peso de la rata en los lotes tratados con aceites de fritura. López Varela y col. (1994) encontraron un aumento en el índice hepatosomático al alimentar a las ratas con dietas elaboradas con aceite de girasol con un contenido en compuestos polares del 19.1%. Sánchez-Muniz y col. (1991) tuvieron resultados similares, pero esta vez, el aceite utilizado era de oliva (sometido a proceso térmico y utilizando como base de fritura, sardinas). En el otro extremo, también se han encontrado variaciones en el índice somático pero a la baja (Benkhalti y col., 2002; Srivastava y col., 2010), donde las ratas alimentadas con aceite de oliva sometido a fritura presentaban un índice somático menor con respecto al grupo control. Al igual que en nuestro caso, Narasimhamurthy y col. (1999), no encontraron alteración en el índice hepatosomático cuando alimentaron ratas, durante 20 semanas, con dietas enriquecidas con un 20% en aceites de fritura. En este caso, los aceites alterados eran: aceite de cacahuete, aceite de sésamo y aceite de coco (con distinto grado de saturación entre sí).

Los niveles de peroxidación lipídica en hígado no mostraron cambios significativos en las ratas tratadas con un 12,5% y un 26,5% de compuestos polares. Sin embargo, en el lote Frito III (con un 33,6% CP), el aumento fue considerable con respecto a los grupos Control e Inicial. Resultados similares se encontraron en trabajos realizados por Quiles y col. (2002) en ratas expuestas a aceite de fritura de oliva y de girasol, o en el trabajo de Srivastava y col. (2010). Izaki y col. (1984)

mostraron que el aumento de la LPO guardaba una relación ascendente y proporcional al grado de deterioro del aceite.

En principio, los ácidos grasos de la dieta pueden influenciar la susceptibilidad de las células al estrés oxidativo, ya que en función de la dieta, se producen cambios en la composición de los ácidos grasos de las membranas celulares (Battino y col, 1999). Como hemos visto, el aceite de oliva es más rico en ácidos grasos monoinsaturados que otros aceites, pero eso no impide que pueda sufrir procesos degradativos que afecten en un futuro a la estabilidad de esas membranas. Los compuestos fenólicos o la vitamina E, podrían tener un efecto protector sobre el ataque radicalario, pero hay experiencias que demuestran que la pérdida de estos compuestos en el aceite, es relativamente rápida (50% de pérdida tras 60 minutos de tratamiento de fritura), con lo cual se une la generación de compuestos polares con la pérdida de los antioxidantes naturales (Battino y col., 2002).

En las actividades enzimáticas (SOD, CAT, GPx y GR) no se observaron cambios significativos entre los distintos grupos experimentales. En este sentido, Ruiz-Gutierrez y col. (1999) encontraron niveles de actividad aumentados en catalasa y glutatión peroxidada en hígado de ratas alimentadas a base de aceite de pescado y en el otro extremo, Valls y col. (2003) y Srivastava y col. (2010), encontraron una disminución significativa de estas mismas actividades enzimáticas con respecto al control, en ratas alimentadas con una dieta rica en grasas. La falta de cambios en la actividad de las enzimas antioxidantes observadas en este estudio se podría explicar debido a que el hígado es el órgano que posee más enzimas de detoxificación y puede hacer frente de forma más efectiva a la acción de los tóxicos.

En relación a la sangre, se sabe que los glóbulos rojos son particularmente susceptibles al daño oxidativo, debido a varias razones:

- Son transportadores del oxígeno, con lo que están expuestos interrumidamente a cierta tensión.
- Prácticamente no tienen capacidad para reparar el daño sufrido en sus componentes.
- La hemoglobina es susceptible de autooxidarse, y las membranas de sufrir peroxidación lipídica (Puppo y col., 1988).

La generación de radicales O_2^- ocurre de manera espontánea en los eritrocitos, induciendo la hemólisis. El peróxido de hidrógeno formado a partir de este radical (por la acción de la SOD), puede causar daños más severos, induciendo a la formación de metahemoglobina. Por ello, todos estos sistemas de defensa, están muy relacionados con la esperanza de vida del glóbulo rojo, la cual se correlaciona de forma positiva con la actividad de los sistemas antioxidantes (Sohal y col., 1987).

En el caso de la peroxidación lipídica en plasma, se encontró un aumento significativo y proporcional con el nivel de compuestos polares de la dieta. Varios autores (Hochstein y col., 1981; Pfeffer y Swislocki, 1982) indican que el malonildialdehído (producto de la peroxidación lipídica), induce la formación de enlaces en la molécula de espectrina, lo cual reduce la capacidad del eritrocito para deformarse; limitando así su paso a través de los capilares sanguíneos. La flexibilidad del glóbulo rojo es una propiedad intrínseca del eritrocito (por la propia composición lipídica y proteica de la membrana). El establecimiento de estos enlaces, altera también las propiedades inmunológicas, ya que se exponen nuevos antígenos (que antes estaban ocultos y que presumiblemente se desenmascaran gracias a la desestabilización de la bicapa lipídica) (Hebbel y Miller, 1984; Kay y col., 1986). Los nuevos antígenos mostrados hacen que la célula sea más susceptible a ser fagocitada por el sistema reticuloendotelial (Jain, 1988).

En cuanto a la actividad de las enzimas antioxidantes, en la superóxido dismutasa (SOD), se observó un aumento significativo en los lotes tratados con aceite de oliva frito (12,5%, 26,5% y 33,6% de

compuestos polares). Las diferencias se observaron con respecto a los grupos Control e Inicial. En un principio, la progresión es ascendente, produciéndose un punto de inflexión en el Frito II, a partir del cual decrece la actividad de esta enzima. En sangre, cuando se observan diferencias significativas en los distintos biomarcadores, siempre se repite este patrón. Una posible explicación podría ser el que a determinados niveles de especies reactivas, los agentes enzimáticos detoxicantes ya no son capaces de compensar su efecto, lo que da una idea de la afectación del sistema. Parece ser que la actividad SOD en sangre es bastante uniforme si comparamos entre los distintos mamíferos.

En la actividad catalasa, los resultados muestran la misma distribución que la SOD, aunque las diferencias significativas se muestran únicamente en el grupo Frito II (26,5% CP, diferencias con respecto a los lotes Control e Inicial). Nuevamente se observa una depleción de la actividad enzimática en el Frito III, debido quizás a un exceso de peróxidos. Existen numerosas referencias que discuten si el papel de la catalasa en el sistema defensivo del eritrocito juega un papel más importante que otros sistemas (Gaetani y col., 1989; Suzuki y col., 1985). Harían falta más datos para poder llegar a una conclusión en este sentido.

En cuanto a GPx y GR, no se encontraron diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales. El rango de actividad de la GPx en los eritrocitos es bastante variado entre los mamíferos (Agar y col., 1982; Suzuki y col., 1984) e incluso son evidentes las variaciones entre los individuos de una misma familia (Suzuki y col., 1985; Kurata y col., 1993) o entre sexos (Guemouri y col., 1991).

Hay estudios (Kurata y col., 1993; Gaetani y col. 1996; Nakababu y col., 2003) que evidencian que, en condiciones fisiológicas, el papel de la GPx en los eritrocitos es más importante que el de la catalasa (a la hora de eliminar el peróxido de hidrógeno que pudiera generarse), y que sólo cuando la concentración de H_2O_2 es

muy alta, entra en juego este sistema. En este estudio hemos encontrado diferencias significativas en la actividad catalasa, con lo que nos puede dar una idea del grado de afección de los individuos, y ello explicaría la no existencia de cambios significativos en la actividad GPx.

En cuanto a las determinaciones bioquímicas del suero sanguíneo, Quiles y col. (2004), en un estudio llevado a cabo en ratas Wistar donde se les suministraba dietas elaboradas con dos tipos distintos de grasas como base (aceite de oliva vs. aceite de girasol), determinaron que los niveles de colesterol y de triglicéridos en plasma estaban incrementados en aquellos animales alimentados con la dieta a base de aceite de girasol (más rica en PUFAs). Estas dietas tenían la cantidad de aceite habitual en las dietas comerciales de roedores y no estaban sometidos a ningún tipo de procesado (como puede ser la fritura). Del mismo modo, Amina y col. (2014), en un estudio sobre estrés oxidativo en ratas control y obesas, y donde se utilizaron como base distintos aceites vegetales (girasol, oliva y linaza) encontraron que la cantidad de glucosa, colesterol y de triglicéridos en plasma, eran significativamente mayor en las ratas obesas que en las control. En nuestro estudio, los niveles de glucosa y colesterol permanecen prácticamente inalterados entre los distintos grupos experimentales (p valor > 0.05), pero el nivel de triglicéridos disminuye significativamente con respecto al grupo Inicial en los grupos Frito II y Frito III. En este aspecto, obtenemos el efecto contrario.

En nuestro estudio, la AST aumenta significativamente en los grupos Frito II y Frito III, con respecto a los grupos Control e Inicial. La enzima AST, cataliza la reacción de transferencia de un grupo amino desde el L-aspartato al 2-oxoglutarato, formándose L-glutamato y oxalacetato. Está presente en muchos tejidos del organismo, como el hígado, el corazón, los músculos, los riñones y el cerebro. Si cualquiera de estos órganos o tejidos se viera afectado por una lesión o por una enfermedad, se liberaría esta enzima al torrente sanguíneo; siendo éste, nuestro caso. La AST no es un indicador específico de daño

hepático, como lo es la ALT, que es una enzima que se encuentra casi exclusivamente en el hígado; por tanto, el que esté aumentada puede ser indicativo de daño sistémico en los grupos Frito II (26,5%CP) y Frito III (33,6%CP).

A nivel global, los resultados obtenidos en este estudio muestran que el aceite de oliva virgen (variedad Hojiblanca) sometido a repetidos procesos de fritura da lugar a efectos tóxicos en ratas Wistar macho tanto a nivel histológico como bioquímico, incluso los que contienen un nivel de compuestos polares inferior al establecido en la legislación, afectándose en mayor medida el sistema cardiovascular.

6. CONCLUSIONES

PRIMERA.- La ingestión subcrónica de aceite de oliva virgen extra (variedad Hojiblanca), sometido a repetidos procesos de fritura, da lugar a efectos tóxicos tanto a nivel histológico como bioquímico, incluso en los que contienen un nivel de compuestos polares inferior al establecido en la legislación.

SEGUNDA.- El daño oxidativo ocurre a nivel de todos los componentes celulares, pero es en las membranas celulares donde el efecto es mayor; de ahí que, de todos los indicadores de estrés oxidativo medidos, la peroxidación lipídica sea el más sensible.

TERCERA.- Se observa una depleción de la actividad en algunos sistemas enzimáticos, probablemente porque éstos estén desbordados. A la luz de los resultados obtenidos en el análisis de las preparaciones histológicas, parece que el sistema defensivo antioxidante no es capaz de frenar el efecto producido por los compuestos polares.

CUARTA.- El órgano menos afectado, en cuanto a la actividad de enzimas antioxidantes se refiere, fue el hígado. Esto está en consonancia con el hecho de que el hígado sea el órgano detoxicador por excelencia.

QUINTA.- A nivel histológico, el sistema más afectado es el cardiovascular.

SEXTA.- Comparando con el grupo Control, el esperado efecto protector del aceite de oliva virgen extra en el grupo Inicial, no se produce. Podría deberse a dos razones: o bien porque el tiempo de exposición a las dietas ha sido insuficiente, o porque se han degradado la mayor parte de las sustancias antioxidantes durante el proceso de almacenamiento.

SÉPTIMA.- Si pudiésemos extrapolar estos resultados al ámbito doméstico, la ingestión de aceite sometido a repetidos procesos de fritura no supondría mayor peligro, ya que el aceite probablemente se desecha antes de que éste alcanzara un nivel de compuestos polares peligroso para el organismo. No obstante, habría que prestar mayor atención al ámbito industrial o de restauración.

OCTAVA.- Aunque los resultados se refieren en todo momento al modelo experimental de rata Wistar, éstos sugieren la conveniencia de una revisión de la legislación actualmente en vigor; la cual data de 1989.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Agar N.S. y Suzuki T. (1982). Red cell metabolism in buffaloes and camels. *Journal of Experimental Zoology*. 223, 25-28.
- Alan D. (1999). *The Oxford Companion to Food*. Oxford University Press. Pp. 554-555.
- Alharbi M.M y Alkahtani H.A. (1993). Chemical and biological evaluation of discarded frying palm oil from commercial restaurants. *Food Chemistry*. 48, 395-401.
- Lu A.L., Li X., Gu Y., Wright P.M. y Chang D.Y. (2001). Repair of oxidative DNA damage. *Cell Biochemistry and Biophysics*. 35, 141-170.
- Amina A., Hafida M., Sid Ahmed M. y Michel N. (2013). Blood oxidant/antioxidante status in overfed aging rats: comparative effects os sunflower and olive-linseed mixture oil Rich diets. *Biomedical and Environmental Sciences*. 26, 765-768.
- Ansorena D., Guembe A., Mendizábal T. y Astiasarán I. (2010). Effect of fish and oil nature on frying process and nutritional product quality. *Journal of Food Science*. 75,.62-67.
- Battino M., Bullon P., Wilson M. y Newman H. (1999). Oxidative injury and inflamatory periodontal diseases: the challenge of anti-oxidants to free radicals and reactive oxygen species. *Critical Reviews in Oral Viology and Medicine*. 10, 458-476.

- Battino M., Quiles J.L., Huertas J., Ramírez-Tortosa M.C., Casinello M., Mañas M., López-Frías M., Mataix J. (2002). Feeding fried oil changes antioxidant and fatty acid pattern of rats and affects rat liver mitochondrial respiratory chain components. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 34, 127-134.
- Benkhalti F., Prost J., Paz E., Pérez-Jiménez F., El Modafar C., El Boustani E. (2002). Effects of feeding virgin olive oil or the polyphenols on lipid of rat liver. *Nutrition research*. 22, 1067-1075.
- Beynen AC (1999). Nutrición y resultados experimentales. En: *Principios de la Ciencia del Animal de Laboratorio. Una contribución al empleo y cuidado humanitario de los animales y a la calidad de los resultados experimentales*. Van Zutphen LFM, Baumans V, Beynen AC (Eds.). Elsevier. Pp. 121-140.
- Billek, G. (1985). Heated fats in the diet. En: *the Role of Fats in the Human Nutrition*. [F.B. Padley and J. Podmore, editors, in collaboration with J.P. Brun, R. Burt and B.W. Nicols]. Chichester: Ellis Horwood Ltd.. Pp. 163-171
- Binkoski A.E., Kris-Etherton P.M., Wilson T.A., Mountain M.L. y Nicolosi R.J. Balance of unsaturated fatty acids is important to a cholesterol-lowering diet: comparison of mid-oleic sunflower oil and olive oil on cardiovascular disease risk factors. *Journal of the American Dietetic Association*. 105, 1080-1086.

- Bradford M. (1976). A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72, 248-254.
- Calberg I., Mannervik B. (1975). Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *Journal of Biological Chemistry*. 250, 5475-5480.
- Chanin B.E., Valli, V.E., Alexander, J.C. (1988). Clinical and histopathological observations with rats fed laboratory heated or deep-fried fats. *Nutritional Research*. 8, 921-928.
- Cicerale S., Conlan X.A., Sinclair A.J., Keast R.S. (2009). Chemistry and health of olive oil phenolics. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 49, 218-36.
- Clark W.L. y Serbia G.W. (1991). Safety aspects of frying fat oils. *Food Technology*. 45, 84-89.
- Covas M.I., Konstantinidou V., Fitó M. (2009). Olive oil and cardiovascular health. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 54, 477-482.
- Danby S.G., AlEnezi T., Sultan A., Lavender T., Chittock J., Brown K., Cork M.J. (2013). Effect of olive and sunflower seed oil on the adult skin barrier: implications for neonatal skin care. *Pediatric Dermatology*. 30, 42-50.
- Denominaciones de Origen e Indicaciones Geográficas Protegidas

(<http://www.magrama.gob.es/es/alimentacion/temas/calidad-agroalimentaria/calidad-diferenciada/dop/>).

- Esterbauer H., Cheeseman K.H. (1990). Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonetal. *Methods in Enzymology*. 186, 407-421.
- Fang J.L., Vaca C.E., Valsta L.M., Mutanen M. (1996). Determination of DNA adducts of malonaldehyde in humans: effects of dietary fatty acid composition. *Carcinogenesis*. 17, 1035-1040.
- Fernández-Real J.M., Bulló M., Moreno-Navarrete J.M, Ricart W., Ros E., Estruch R., Salas-Salvadó J. (2012). A Mediterranean diet enriched with olive oil is associated with higher serum total osteocalcin levels in elderly men at high cardiovascular risk. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 97, 3792-3798.
- Firestone D. (1993). Worldwide regulation of frying fats and oil. *INFORM*. 4, 1366-1371.
- Gaetani G.F., Galiano S., Canepa L., Ferraris A.M., Kirkman H.N. (1989). Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes. *Blood*. 73, 334-339.
- Gaetani G.F., Ferraris A.M., Rolfo M., Mangerini R., Arena S., Kirkman H.N. (1996). Predominant role of catalase in the disposal of hydrogen peroxide within human erythrocytes. *Blood*. 87, 1595-1599.

- Garrido-Polonio C., García-Linares M.C., García-Arias M.T., López-Varela S., García-Fernández M.C., Terpstra A.H.M., y Sánchez-Muniz F.J. (2004). Thermally oxidised sunflower-seed oil increases liver and serum peroxidation and modifies lipoprotein composition in rats. *British Journal of Nutrition*. 92, 257-265.
- Grootveld M. A. Atherton M. D et al. (1998). *Journal of Clinical Investigation*. 101, 1210-1218.
- Gupta R., Vind S.K., Singh S.P., Kumar S., Kumar M. (2014). The effect of different deep fried vegetable oil on cardiovascular susem in rats model. *World Journal of Pharmaceutical Research*. 3, 1130-1139.
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C. (1999). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, Oxford.
- Haro-Mora J.J., García-Escobar E., Porras N., Alcázar D., Gaztambide J., Ruíz-Órpez A., García-Serrano S., Rubio-Martín E., García-Fuentes E., López-Siguero J.P., Soriguer F., Rojo-Martínez G. (2011). Children whose diet contained olive oil had a lower likelihood of increasing their body mass index Z-score over 1 year. *European Journal of Endocrinology*. 165, 435-439.
- Hebbel R.BN., Miller W.J. (1984). Phagocytosis of sickle erythrocytes: immunologic and oxidative determinants of emoythic anemia. *Blood*. 63, 733-741.

- Hemans C., Kummerow F. y Perkins E.G. (1973). Influence of proteins and vitamins levels of the nutritional value of heated fats for rats. *Journal of Nutrition*. 103, 1655-1672.
- Hochstein P., Jain S.K. (1981). Association of lipid peroxidation and polymerisation of membrane proteins with erythrocyte aging. *Federation Proceedings* .40, 183-188.
- Huang C.Y., Chen L.H., Osio Y., Cohen D.A. (1994). Effects of diet composition on liver antioxidant defence and detoxification enzymes in mice with murine AIDS. *Nutrition Research*. 14, 1841-1851.
- Izaki Y., Yoshikawa S., Uchiyama M. (1984). Effect of ingestion of thermally oxydized frying oil on peroxidative criteria in rats. *Lipids*. 19, 324-331.
- Jain S.K. (1988). Evidence for membrane lipid peroxidation during the in vivo aging of human erythrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta*. 937, 205-210.
- Kay M.M.B., Bosman G.C., Shapiro S.S., Bendich A., Bassel P.S. (1986). Oxidation as a possible mechanism of cellular aging: vitamin E deficiency causes premature aging and IgG binding to erythrocytes. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences USA*. 83, 2463-2467.
- Kiechl-Kohlendorfer U., Berger C., Inzinger R. (2008). The effect of daily treatment with an olive oil/lanolin emollient on skin integrity I preterm infants: a randomized controlled trial. *Pediatric Dermatology*. 25, 174-178.

- Kok T.M.C.M., Vaarweck F., Zwingman I., Maanen J.M.S., Kleinjans J.C.S. (1994). Peroxidation of linoleic, arachidonic and oleic acid in relation to the induction of oxidative DNA damage and cytogenetic effects. *Carcinogenesis*. 15, 1399-1404.
- Kurata M., Suzuki M., Agar N.S. (1993). Antioxidant systems and erythrocyte life-span in mammals. *Comparative Biochemistry and physiology*. 106, 477-487.
- Lanteaume M.T., Ramel P., Acker P., Le Clerk A.M. y Wirth C. (1968). Physiological effects on the dog of a heat degraded very unsaturated oil. *Revue Française des Corps Gras* 15, 71-79.
- Lawrence A., y Burk R.F. (1976). Glutathione peroxidase activity in selenium deficient rat liver. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 71, 952-958.
- Lee J., Lee S., Lee H., Park K. y Choe E. (2002). Spinach (*Spinacia oleracea*) powder as a natural food-grade antioxidant in deep-fat-fried products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50, 5664-5669.
- Levine R.L., Garland, D., Oliver, C.N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A.G., Ahn, B.W., Shatiel, S., Stadman, E.R., 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*. 186, 464-478.
- López.Varela S., Sánchez Muniz F.J. y Cuesta C. (1995). Decreased food efficiency ratio, growth retardation and changes in liver fatty acid composition in rats consuming

thermally oxidized and polymerised sunflower oil used for frying. *Food and Chemical Toxicology*. 33, 181-189.

- López-Varela S., Sánchez-Muniz F.J. (1997). Lipaemia and liver composition in pregnant rats consuming olive oil and olive oil used for frying. *Zeitschrift für Ernährungswissenschaft*. 36, 205-213.
- Luchetti F. (2003). Introducción al estudio del aceite de oliva. En: *Manual del aceite de oliva*. Aparicio R., Harwood J. (Eds.). A Madrid Vicente Ediciones, Ediciones Multiprensa. Madrid. Pp. 13-31.
- Manoj K. , Das M. (2006). Assessment of carcinogenic potential of repeated fish fried oil in mice. *Molecular Carcinogenesis*. 45, 741-751.
- Marquez-Ruiz, G., Dobarganes. (2006). M.C. Nutritional and physiological effects of used frying oils and fats. *Deep Frying: Chemistry Nutrition and Practical Applications*. Pp 177-207
- Marquez-Ruiz G, Pérez-Camino MC, Dobarganes MC (2000) Digestibility of fatty acids monomers, dimers and polymers in the rat. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 69, 930-934.
- Martín-Peláez S., Covas M.I., Fitó M., Kusar A., Pravst I. (2013). Health effects of olive oil polyphenols: recent advances and possibilities for the use of health claims. *Molecular Nutrition and Food Research*. 57, 760-771.

- Martínez E (2001). Nutrición y alimentación. En: Ciencia y Tecnología en Protección y Experimentación Animal. Martín J, Tur J, Milocco S, Piñeiro R (Eds.). McGraw-Hill Interamericana. Pp. 109-151.
- Martínez M., Andrés D., Zubillaga M., Hager A., De Paoli T. y Boccio J. (2006). Conceptos actuales del metabolismo de la glutatión. Utilización de los isótopos estables para la evaluación de su homeostasis. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana. 40, 45-54.
- McCord J.M., Fridovich I. (1969). An enzymic function for erythrocyte cytochrome b₅ (hemocytobiline reductase). Journal of Biological Chemistry. 244, 6049-6055.
- Morales MT (2006). Grasas y aceites alimentarios. En: Toxicología Alimentaria. Camenán AM, Repetto M (Eds.). Díaz de Santos. Madrid. Pp. 517-537.
- Nakababu E., Chrest, F.J., Rifkind, J.M. (2003) Hydrogen-peroxide-induced heme degradation in red blood cells: the protective roles of catalase and glutathione peroxidase. Biochimica and Biophysica Acta. 1620, 211-217.
- Narasimhamurthy K. y Raina P.L. (1999). Long term feeding effects of heated and fried oil on lipids and lipoproteins in rats. Molecular and Cellular Biochemistry. 195, 143-153.
- Nidhi B., Mamatha B.S., Baskaran V. (2014). Olive oil improves the intestinal absorption and bioavailability of lutein in lutein-deficient mice. European Journal of nutrition. 53, 117-126.

- Norma comercial del Consejo Oleícola Internacional (COI/T.15/NC nº3/Rev. 7 de mayo de 2013)
- Nwanguma BC, Achebe AC, Ezeanyika LUS, Eze LC (1999) Toxicity of oxidized fats. II. Tissue levels of lipid peroxides in rats fed a thermally oxidized corn oil diet. *Food and Chemical Toxicology*. 37, 413-416.
- Ochoa J.J., Quiles J.L., Ibáñez S., Martínez E., López-Frías M., Huertas J.R. y Mataix J. (2003). Aging-related oxidative stress depends on dietary lípido source in rat postmitotic tissues. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 35, 267-275.
- Orden de 26 de enero de 1989, por la que se aprueba la norma de calidad para los aceites y grasas calentados. BOE-A-1989-2265.
- Orozco-Solano M.I., Priego-Capote F. y Luque de castro M.D. (2011). Influence of simulated deep frying on the antioxidant fraction of vegetable oils alter enrichment with extracts from olive oil pomace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59, 9806-9814.
- Owen R.W., Haubner R., Würtele G., Hull E., Spiegelhalder B., Bartsch H. (2004). Olives and olive oil in cancer prevention. *European Journal of Cancer Prevention*. 13, 319-326.
- Papadopoulus G, Boskou D. (1991). Antioxidant effect of natural phenols in olive. *Journal of American Oil Chemists' Society*. 68, 669-672.

- Pérez-Granados A.M., Vaquero P., y Navarro P. (1999). Effects of diets containing oils from repeated frying on magnesium absorption. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 79, 699-706.
- Pérez Jimenez F., Lista J.D., Pérez-Martínez P., López-Segura F., Fuentes F., Cortés B., Lozano A., López- Miranda J. (2006). Olive oil and homeostasis: a review on its healthy effects. *Public Health Nutrition*. 9, 1083-1088.
- Pérez-Jiménez F., Ruano J., Pérez-Martínez P., López-Segura F., López-Miranda J. (2007). The influence of olive oil on human health: not a question of fat alone. *Molecular Nutrition and Food research*. 51, 1199-1208.
- Perona J.S., Arcemis C., Ruiz-Gutierrez V. y Catalá A. (2008). Effect of dietary high-oleic acid oils that are Rich in antioxidants on microsomal lípido peroxidation in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53, 730-735.
- Pfeffer S.R., Swislocki N.I. (1982). Role of peroxidation in erythrocyte aging. *Mechanisms of Ageing and Development*. 18, 355-367.
- Puppó, A., Halliwell, B. (1988) Formation of hydroxyl radicals in biological systems. Does myoglobin stimulate hydroxyl radical formation from hydrogen peroxide?. *Free Radical Research Communications*. 4, 415-422.
- Quiles J.L., Huertas J.R., Battino M., Mataix J. (2002). The intake of fried virgin olive or sunflower Oil differentially induces

oxidative stress in rat liver microsomes. *British Journal of Nutrition*. 88, 57-65.

- Quiles J.L., Ochoa J.J., Ramirez-Tortosa C., Battino M., Huertas J.R., Martín Y., Mataix J. (2004). Dietary fat type (virgin olive vs. Sunflower oils) affects age-related changes in DNA double-strand-breaks, antioxidante capacity and blood lipids in rats. *Experimental Gerontology*. 39, 1189-1198.
- RD 1201/2005, de 10 de octubre, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. BOE-A-2005-17344.
- Repetto M (1997) *Toxicología fundamental*. 3ª edición. Díaz de Santos. Madrid. pp. 406.
- Romero A., Cuesta C., Sánchez-Muniz (1999). Does frequent replenishment with fresh monoenoic oils permit the frying of potatoes indefinitely?. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 47, 1168-1173.
- Rodríguez A., Cuesta C., Sánchez-Muniz F.J. y Valera G. (1984). Estudio de las alteraciones en grasas, producidas por frituras e incidencia de su administración sobre el peso e ingesta. *Grasas y aceites*. 35, 22-28.
- Ruiz-Gutierrez V., Pérez-Espinosa A., Vázquez C.M., Santa-María C. (1999). Effects of dietary fats (fish, olive and high-oleic-acid sunflower Oil) on lipid composition and antioxidant encimes in rat liver. *British Journal of Nutrition*. 82, 233-241.

- Sánchez-Muniz y col. (1991). Acceptability of diet containing olive oil fried sardines in the prevention of dietary hipercolesterolemia in rats. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 56, 155-165.
- Sanz P, Ruiz-Gutiérrez V, Rodríguez-Vicente MC, Villar P, Gutiérrez González-Quijano R y Repetto M (1984) Toxicidad de aceites comestibles termoxidados, bioquímica sanguínea y tisular de ratas intoxicadas. *Revista de Toxicología*. 1, 147-155.
- Sohal R.S., Farmer K.J., Allen R.G. (1987). Correlates of longevity in two strains of the housefly, *Musca domestica*. *Mechanisms of Ageing and Development*. 40, 171-179.
- Soni MG, Kimura H, Burdock GA (2001) Chronic study of diacylglycerol oil in rats. *Food and Chemical Toxicology*. 39, 317-329.
- Srivastava S., Singh M., George J., Bhui K. y Shukla Y. (2010). Genotoxic and Carcinogenic Risks Associated with the Consumption of Repeatedly Boiled Sunflower Oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58, 11179-11186.
- Suzuki T., Agar N.S., Suzuki M. (1985). Red blood cell metabolism in experimental animals: pentose-phosphate pathway, antioxidant enzymes and glutathione. *Experimental Animals*. 34, 353-366.
- Valls V., Goicoechea M., Muñiz P., Saez G.T., Cabo J.R. (2003). Effect of corn oil and vitamin E on the oxidative status of adipose tissues and liver in rat. *Food Chemistry*. 81, 281-286.

Bibliografía

- Varela G., Ruíz-Rosos B. (2003). Algunos aspectos nutricionales del aceite de oliva. En: Manual del aceite de oliva. Aparicio R., Harwood J. (Eds.). A Madrid Vicente Ediciones, Ediciones Multiprensa. Madrid. Pp. 13-31.
- <http://web.archive.org/web/20100515141537/http://www.mapa.es/es/alimentacion/pags/denominacion/resultado1.asp>
- www.internationaloliveoil.org
- Zorrilla A.E. (2002). El envejecimiento y el estrés oxidativo. Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas. 21, 178-185.