

CATEDRA DE FARMACIA GALENICA Y TECNICA  
PROFESIONAL Y LEGISLACION

Prof. Dr. J. M.<sup>a</sup> Suñé

**Método colorimétrico para determinar el enranciamiento  
de aceites y grasas sólidas**

por

J. Oliver y J. M.<sup>o</sup> Suñé (\*)

En las determinaciones seriadas del Índice de Saponificación, que veníamos efectuando para determinar la alterabilidad de los ceratos hidratados y anhidros, con y sin bórax y del "Cerato de Esperma de ballena" de F.E.IX., observamos reiteradamente, durante la saponificación de dichas muestras con potasa alcohólica, la aparición de una coloración que variaba del amarillo al rojo ladrillo según el grado de autoxidación de las mismas y que llegaba incluso a entorpecer la determinación de dicho índice.

La constancia del fenómeno y el incremento de su intensidad a medida que progresaba el enranciamiento de las muestras nos hizo sospechar que el curso de un proceso autoxidativo podía seguirse coloriméricamente. Para confirmar la certeza de esta sospecha iniciamos una investigación planificada intentando fijar todas las variables que intervienen en la reacción.

1.<sup>o</sup>—COMPROBACION DE LA INFLUENCIA DEL GRADO DE ENRANCIAMIENTO SOBRE EL INCREMENTO DEL COLOR, MEDIDO POR SU DENSIDAD OPTICA (do), EN LAS MUESTRAS SAPONIFICADAS CON POTASA ALCOHOLICA.

A pesar de la reiterada observación visual del fenómeno en las numerosas saponificaciones efectuadas para determinar el Índice de Saponificación, decidimos hacer una prueba colorimétrica con muestras recientes y muestras francamente enranciadas, con el fin de asegurar la certeza del hecho antes de proseguir la investigación.

Para la prueba empleamos la fórmula del siguiente cerato hidratado:

Aceite de almendras dulces ...	56 g
Cera blanca ... ..	10 g
Esperma de ballena ... ..	14 g
Agua de rosas ... ..	20 g

(\*) Extracto de la tesis doctoral del Dr. J. Oliver, dirigida por el Profesor J. M.<sup>a</sup> Suñé, Granada 1964.

De esta fórmula, el día de la determinación, preparamos una muestra (muestra A); de la misma fórmula elegimos una segunda muestra (muestra A<sub>1</sub>) que llevaba 157 días de preparada y envasada en caja de plástico cerrada y precintada, y una tercera muestra (muestra A<sub>2</sub>) preparada 129 días antes de la determinación, envasada en caja de plástico abierta. Ambas muestras se guardaban en estufa a 34° C y las dos, el día de la experiencia olían francamente a rancio.

Para la lectura colorimétrica empleamos un colorímetro "EEL" al que acoplamos el filtro azul que corresponde a una longitud de onda de 540 milimicras.

Para las determinaciones del índice de saponificación y de la densidad óptica se pesaron exactamente, de cada muestra, alrededor de 2 gramos: a este peso se añadieron 25 ml de solución alcohólica de potasa 0,5 N (preparada siempre con alcohol etílico destilado con potasa) y la saponificación se prolongó durante 30 minutos sobre baño de maría, a reflujó y con frecuente agitación. La lectura de la densidad óptica se hizo al minuto de sacadas las muestras de la ebullición. Los resultados fueron los siguientes (\*):

Muestra	I. Saponif.	do
"A"	146,9	6,2
"A <sub>1</sub> "	148,5	19,2
"A <sub>2</sub> "	170,4	68,9

En estas determinaciones observamos que, si bien el filtro azul es el complementario del color, conviene

emplear el filtro verde (longitud de onda = 480 milimicras) porque con él las lecturas de las densidades ópticas de las muestras más enranciadas pueden hacerse en la escala graduada en unidades del limbo del colorímetro. Por ello en lo sucesivo decidimos emplear este filtro.

La consideración de estos resultados permite vislumbrar la utilidad de la colorimetría para seguir un proceso de autoxidación y, en principio sacar las consecuencias siguientes:

- Que el grado de enranciamiento influye poderosamente en la intensidad del color y en consecuencia en la densidad óptica apreciada en el colorímetro.
- Que la sensibilidad del método colorimétrico es, en este caso, muy superior a la determinación del índice de saponificación, con el que no guarda paralelismo alguno.

## 2.º—COMPROBACION DE SI LA REACCION COLORIMETRICA CUMPLE CON LA LEY DE BEER.

Para esta comprobación utilizamos la misma fórmula de cerato hidratado pero con agua de rosas.

La fórmula llevada preparada 113 días en caja de plástico abierta, guardada todo este tiempo en estufa a 34° C y en el día de la experiencia olía francamente a rancio.

Con ella se hicieron dos pruebas paralelas ("prueba 1" y "prueba 2"). Para ambas se tomaron muestras de peso alrededor de 0,5, 1, 1,5, y 2 gramos, pesados con exactitud. Para la saponificación de la "prueba 1" se

(\*) Los valores corresponden en todos los casos a la media de tres o de cinco determinaciones.

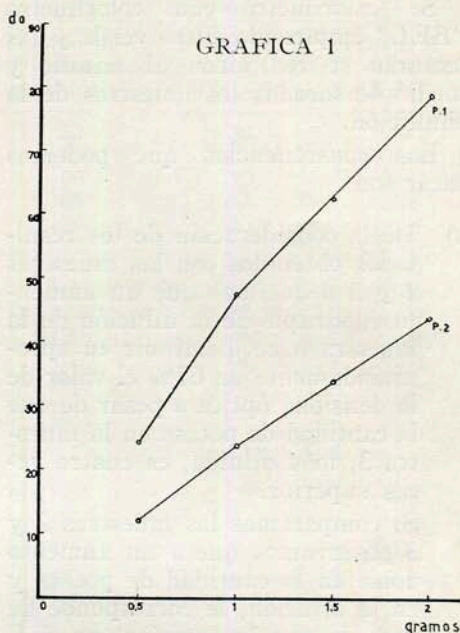
emplearon 25 ml de potasa alcohólica 0,5 N y para la saponificación de la "prueba 2" 50 ml de la misma solución de potasa. En ambas el tiempo de saponificación fue de 30 minutos. Para la colorimetría usamos el colorímetro "EEL" con filtro verde y las lecturas de las densidades ópticas se hicieron al minuto de sacadas las muestras de la ebullición.

Los resultados obtenidos fueron :

Peso muestra (g)	do "Pruebas"	do "Pruebas"
0,5000	24,36	11,99
1,0000	47,20	23,94
1,5000	62,78	33,77
2,0000	78,03	43,60

Transportados estos resultados sobre unos ejes de coordenadas obtenemos la gráfica 1 de cuya consideración deducimos :

- Que para un peso de muestra comprendido entre 1 y 2 gramos las densidades ópticas leídas son proporcionales a las concentraciones de sustancia y que por tanto, cumplen con la Ley de BEER.
- Que conviene saponificar las muestras con 50 mililitros de potasa alcohólica 0,5 N, pues de esta forma las lecturas, tanto de las muestras recientes como de las muy enrancadas, caen dentro de la escala graduada en unidades del limbo del colorímetro.



Con el fin de comprobar si la disminución de la densidad óptica observada en la comparación de ambas pruebas se debe sólo a la dilución o bien a la menor cantidad de potasa en las soluciones alcohólicas empleadas para la saponificación, tomamos muestras de la misma fórmula que guardábamos en estufa a 34° C durante 124 días, envasada en caja de plástico abierta y de fuerte olor a rancio en el día de la experiencia, las sometimos a saponificación durante 30 minutos variando la dilución y la concentración en potasa de la forma que se indica en el cuadro siguiente (peso 2 gramos) :

Muestra	Saponificación con	Contenido en KOH	do
1	25 ml KOH a'coh. 0,5 N	0,7 g	80
2	50 ml id. id.	1,4 g	51
3	100 ml id. id.	2,8 g	26
4	100 ml KOH alcoh. 0,25 N	1,4 g	22

Se colorimetró con colorímetro "EEL" empleando filtro verde y las lecturas se realizaron al minuto y medio de sacadas las muestras de la ebullición.

Las consecuencias que podemos sacar son :

- a) De la consideración de los resultados obtenidos con las muestras 1 y 3 deducimos que un aumento cuádruple de la dilución de la muestra hace disminuir en aproximadamente un 67% el valor de la densidad óptica a pesar de que la cantidad de potasa en la muestra 3, más diluída, es cuatro veces superior.
- b) Si comparamos las muestras 2 y 3 observamos que a un aumento doble en la cantidad de potasa y en la dilución, le corresponde de acuerdo con lo anterior, un descenso aproximado del 50% en el valor de la densidad óptica.
- c) Las muestras 2 y 4 contienen igual cantidad de potasa pero como la dilución de la muestra 4 es doble en relación con la de la muestra 2, el valor de la densidad óptica en aquella muestra descendiendo también aproximadamente en un 50%, puesto que una variación de cuatro unidades de densidad óptica (que es la que se aprecia entre las muestras 3 y 4) en pesos aproximados de 2 gramos no es significativa.

De todo ello deducimos que, de acuerdo con la Ley de BEER en los valores de la densidad ópticos influye poderosamente la dilución de las muestras.

Lo dicho permite suponer, por otra parte, que la aparición del color se debe a una reacción, bien entre los productos resultantes de la autoxida-

ción con la potasa alcohólica, bien entre ésta y los componentes del cerato, o también a una polimerización, en presencia de potasa, de determinados compuestos formados como consecuencia de la autoxidación. Lógicamente la intensidad de color disminuye cuando se aumenta la dilución de las muestras por adición de alcohol etílico.

A continuación comprobamos la influencia de la concentración de la solución de potasa alcohólica sobre las densidades ópticas. Para ello utilizamos la fórmula del excipiente hidratado adicionado de un 0,05% de N.D.G.A. La muestra estuvo sometida a oxidación acelerada durante 192 días y 128 días siguientes guardada en estufa a 34° C. El día de la experiencia olía francamente a rancio. Para la saponificación se emplearon 50 ml de soluciones de potasa alcohólica de distinta normalidad. La colorimetría se efectuó en un fotocolorímetro UNICAM a una longitud de onda de 480 milimicras y las lecturas de las densidades ópticas se hicieron al minuto y medio de sacadas las muestras de la ebullición. Los resultados obtenidos fueron, siempre para un peso de 2 gramos :

Muestra	Saponificación con KOH	do
1	0,01 N	4,5
2	0,25 N	20,5
3	0,5 N	25,0
4	1,0 N	29,2
5	2,0 N	40,0
6	3,0 N	58,0

Los resultados prueban que la concentración de las soluciones influye en las lecturas de la densidad óptica por lo que ésta deberá corresponder en toda la investigación a muestras saponificadas con solución de potasa de la misma normalidad.

El resultado obtenido con la solución 0,01 N es sumamente bajo; además antes del minuto y medio de sacada la muestra de la ebullición se produjo un enturbiamiento lechoso que no permitió la colorimetría.

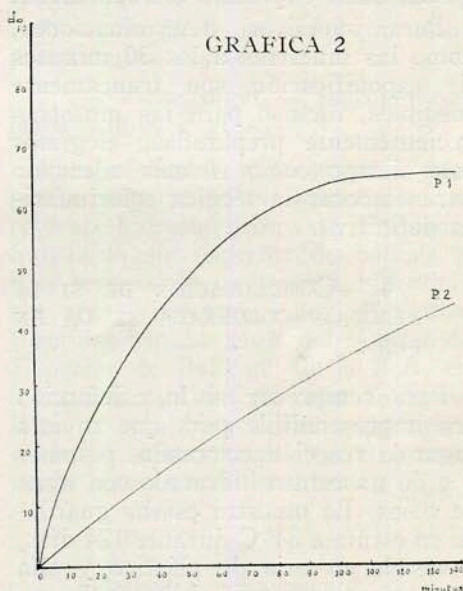
3.º—COMPROBACION DE LA INFLUENCIA DEL TIEMPO DE SAPONIFICACION EN LOS VALORES DE LA DENSIDAD OPTICA.

	do	
Tiempo de Saponificación (minutos)	Prueba 1 (50 ml KOH 0,5 N)	Prueba 2 (75 ml KOH 0,5 N)
30	36	—
40	45	—
50	49	—
60	53	25
70	55	—
80	59	—
90	60	31
100	62	34
110	65	37
120	65	38
130	65	39
140	65	41

Para esta comprobación utilizamos la fórmula completa del "CERATUM SPERMATIS CETI" de la F.E.IX.

Aceite de almendras dulces ... .. 56 g  
 Cera blanca ... .. 10 g  
 Esperma de ballena ... .. 14 g  
 Agua destilada ... .. 20 g  
 Borato sódico ... .. 0,5 g  
 Esencia de rosas ... .. II gotas

Las muestras llevaban 114 días guardadas en estufa a 34° C y envasadas en cajas de plástico cerradas y precintadas. Oían intensamente a rancio el día de la experiencia. Con ellas hicimos dos pruebas y para ambas se pesaron aproximadamente dos gramos. La "prueba 1" la saponificamos con 50 ml de potasa alcohólica 0,5 N y con 75 ml de la misma solución de potasa la "prueba 2". La colorimetría se llevó a cabo con el colorímetro "EEL" empleando filtro verde y la lectura de las densidades ópticas se hizo al minuto y medio de sacadas las muestras de la ebullición. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:



De la consideración de los resultados y estudio de su expresión gráfica (Gráfica 2) deducimos:

a) Que utilizando 50 ml de KOH 0.5 N el valor de la densidad óptica se estabiliza a las dos horas aproximadas de saponificación mientras que si se utilizan 75 ml de la misma solución la estabilización no se alcanza todavía a los 140 minutos.

b) Que los valores para las densidades ópticas con 75 ml de KOH

0,5 N son inferiores a los obtenidos con 50 ml en tiempos de saponificación iguales. Ello es lógico teniendo en cuenta la dilución del primer ensayo.

c) Que las densidades ópticas obtenidas con 50 ml de solución 0,5 N de KOH hasta conseguir la estabilización se encuentran suficientemente espaciadas para los distintos tiempos de saponificación para que sean apreciadas con facilidad, dando al ser trasladadas a unos ejes de coordenadas una línea parabólica muy regular, clara expresión del fenómeno.

Para sucesivas determinaciones, como las muestras a los 30 minutos de saponificación son francamente medibles, incluso para las muestras recientemente preparadas, elegimos este tiempo como el más adecuado para elaborar la técnica colorimétrica definitiva.

#### 4.º—COMPROBACION DE SI LA REACCION COLOREADA SE DA EN FRIJO.

Para comprobar si la calefacción era imprescindible para que tuviera lugar la reacción coloreada, pesamos 2 g de un cerato hidratado con agua de rosas. La muestra estaba guardada en estufa a 34° C durante 124 días, envasada en caja de plástico y oía fuertemente a rancio el día de la experiencia. A la muestra añadimos 50 ml de potasa alcohólica 0,5 N y agitamos durante 30 minutos.

En ensayo paralelo calentamos a ebullición durante 30 minutos un peso de muestra aproximadamente igual adicionada también de 50 ml de la misma potasa alcohólica.

En ambos casos apareció el color pero en la muestra primera surgió más lentamente con menor intensidad. Con aceite de sésamo también

apareció el color operando en frío lo que demuestra que la reacción coloreada tiene lugar incluso en frío y que el calor cataliza o favorece la reacción.

#### 5.º—COMPROBACION DE LOS COMPONENTES QUE INTERVIENEN EN LA REACCION COLORIMETRICA

Con el fin de comprobar a qué componentes se debe la coloración, efectuamos un proceso gradual de exclusión con los siguientes resultados:

a) La potasa alcohólica usada es totalmente incolora antes y después de calentarla a baño de maría y a reflujo en las mismas condiciones de la experiencia.

b) Una muestra de cerato hidratado y rancio a la que se añaden 25 ml de alcohol etílico destilado con potasa y se lleva a ebullición sobre baño de maría, a reflujo, durante 30 minutos no da coloración alguna.

c) El mismo cerato hidratado y rancio, adicionado de 25 ml de solución 0,5 N de potasa acuosa y llevado a ebullición a fuego directo y a reflujo durante 30 minutos, toma un color amarillo turbio que en nada se parece al observado con la potasa alcohólica. Si a este líquido amarillo turbio se le añaden 25 ml del alcohol etílico empleado para preparar las soluciones de potasa alcohólica y se lleva a ebullición a baño maría y a reflujo, aparece el color rojo ladrillo característico de las muestras enrancadas.

d) El mismo cerato hidratado y enrancado, calentado a ebullición con potasa alcohólica y a reflujo, toma color rojo ladrillo.

e) La reacción se da a temperatura ambiente usando potasa alcohólica,

pero la coloración no es tan acentuada.

De los hechos señalados sacamos las consideraciones siguientes:

1.º—La coloración rojo ladrillo que toman las muestras enranciadas en presencia de potasa, de acuerdo con la literatura, es característica de las resinas de aldehído.

2.º—El color amarillo turbio que aparece al calentar las muestras enranciadas en presencia de potasa acuosa, demuestra la formación de una resina de aldehído, insoluble en el agua y que se disuelve en el alcohol etílico, que actúa exclusivamente como disolvente de la turbidez.

3.º—Que la reacción coloreada se dé a temperatura ambiente, aunque con coloración menos intensa, es lógico porque no repugna suponer que en aldehídos superiores se establezca un equilibrio entre el aldol y el aldehído crotonizado, equilibrio que se desplaza tanto más en el sentido de la formación de aldehídos insaturados, cuanto más se eleva la temperatura; aldehídos insaturados que son imprescindibles para la resinificación. Es lógico que cuanto mayor sea la cantidad de aquéllos más elevado peso

molecular tenga la resina de aldehído formada, mayor sea el número de dobles enlaces conjugados y en consecuencia la coloración resulte más intensa.

Demostrada la necesidad de la potasa para que tenga lugar la reacción coloreada y la del alcohol etílico para disolver la turbidez cabe preguntar:

1.º—¿Es necesaria la presencia conjunta de los tres componentes del cerato, a saber: cera, espermaceti y aceite de almendras dulces para que tenga lugar la reacción coloreada?

2.º—¿Se da la reacción con estos componentes aislados?

3.º—¿Tiene lugar la reacción con otros aceites y grasas?

Para contestar a la primera pregunta preparamos una muestra de excipiente hidratado, otra de excipiente hidratado sin esperma de ballena y una tercera de excipiente hidratado sin cera, conforme a las siguientes fórmulas basadas en la del "Cerato de Esperma de Ballena" de la F.E. en las que la cantidad de esperma de ballena o cera blanca del componente excluido se incrementa en el componente céreo que se mantiene.

	—A—	—B—	—C—
	Excipiente hidratado	Excipiente hidratado sin esper- maceti	Excipiente hidratado sin cera
Aceite de almendras	56	56	56
Cera blanca	10	24	—
Esperma de ballena	14	—	24
Agua destilada	20	20	20

Estas muestras fueron envasadas en cajas de plástico abiertas y guardadas en estufa a 34° C. A las 24 y 48 horas se hicieron tres determinaciones concordantes para cada uno de

los índices de acidez, saponificación, yodo y densidad óptica y se tomó el valor medio.

Para la colorimetría se empleó el colorímetro "EEL" con filtro verde.

Las muestras se saponificaron con 50 ml de potasa alcohólica 0,5 N durante 30 minutos. Las lecturas se hicieron a los dos minutos de retiradas las muestras de la ebullición.

Los índices de yodo y de saponifi-

cación los descartamos porque, en tan breve espacio de oxidación, no dieron datos significativos.

Los resultados para el índice de acidez y para la densidad óptica fueron los siguientes:

Excipiente	I. a.		do	
	24 h	48 h	24 h	48 h
A	2,85	2,85	2,9	3,4
B	6,03	6,00	5,5	5,0
C	0,55	0,55	2,8	2,9

De la consideración de estos resultados concluimos:

a) Que no es precisa la presencia conjunta de los tres componentes del cerato para que la reacción coloreada sea positiva.

b) Que el índice de acidez y la densidad óptica son más elevados al incrementar la proporción de cera lógicamente debido al estado inicial de este componente y a su mayor enranciabilidad.

Para comprobar si la reacción coloreada se da con los componentes aislados del cerato determinamos para cada uno de ellos su índice de acidez y su densidad óptica previa saponificación con 50 ml de potasa alcohólica. Los resultados fueron los siguientes:

	I.a.	do
Aceite de almendras	0,51	6
Cera blanca	22,44	25
Espërma de ballena	0,66	5

La colorimetría se efectuó con el colorímetro "EEL" empleando filtro azul.

De la consideración de estos resultados concluimos:

a) Que la reacción coloreada se

produce con cualquiera de los componentes del cerato.

b) Que cuanto más enranciadas están las muestras más intensa es la coloración y mayor el índice de acidez, como se observa en la muestra de cera blanca.

Comprobada la positividad de la reacción con los componentes aislados del cerato, ensayamos la reacción con distintos aceites y grasas. Elegimos muestras de aceite de almendras dulces neutralizado y sin neutralizar, de linaza, de sésamo refinado y bruto, de algodón refinado y manteca de cerdo. En todas estas muestras determinamos el índice de acidez y la densidad óptica.

La colorimetría la preparamos saponificando las muestras con 50 ml de potasa alcohólica 0,5 N durante 30 minutos. Las lecturas se hicieron en colorímetro "EEL" empleando filtro azul y al minuto y medio de sacadas las muestras de la ebullición.

En los aceites de por sí amarillos determinamos su densidad óptica natural. Para ello pesamos aproximadamente 2 gramos de aceite, añadimos 50 ml de potasa alcohólica 0,5 N, agitamos hasta perfecta interposición del aceite en la solución de po-



tasa (cinco minutos) y colorimetramos; por diferencia entre la densidad óptica del saponificado y la densidad óptica natural del aceite obte-

nemos la densidad óptica atribuible al enranciamiento (do corregida).

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

	<i>I.a.</i>	<i>do corregida</i>
A. de almendras neutralizado ... ..	0,51	6
A. de almendras sin neutralizar ... ..	1,48	18,5
A. de oliva ... ..	0,74	21
A. de sésamo refinado... ..	0,57	2,5
A. de linaza... ..	2,04	18
A. de algodón refinado... ..	0,28	8
Manteca de cerdo ... ..	0,34	1

Los resultados demuestran que la positividad de la reacción se manifiesta con todos estos aceites y grasas.

Dentro de una misma muestra la intensidad de color y el índice de acidez aumenta con el enranciamiento. A fin de determinar si el incremento de la densidad óptica se debe al aumento de acidez, consecuencia de la autoxidación o bien simplemente a la formación de resinas de aldehído, preparamos tres muestras:

una de esperma de ballena a la que adicionamos un 3% de ácido tartárico, que no se disolvió bien en la potasa alcohólica aun después de 30 minutos de ebullición; la segunda de cera blanca adicionada de un 1% de ácido cítrico y una tercera muestra de manteca de cerdo adicionada de un 0,7% del mismo ácido.

Colorimetramos siguiendo la técnica antes descrita y los resultados obtenidos fueron:

	<i>do</i>
Esperma de ballena ... ..	5
Esperma de ballena + 3% de ácido tartárico ... ..	5
Cera blanca ... ..	25
Cera blanca + 1% de ácido cítrico ... ..	24
Manteca de cerdo ... ..	1
Manteca de cerdo + 0,7% de ácido cítrico ... ..	1

Estos resultados parecen demostrar:

a) Que el incremento de acidez no influye en la densidad óptica.

b) Que la densidad óptica se debe exclusivamente a las resinas de aldehído formadas a partir de aldehídos con grupos metilénicos reactivados en su molécula y producidos a par-

tir de los peróxidos formados en el proceso de enranciamiento.

#### 6.º—COMPROBACION DEL TIEMPO MAS ADECUADO PARA LA LECTURA COLORIMETRICA.

Con esta comprobación intentamos determinar la influencia que sobre la lectura de la densidad óptica puede

tener el tiempo que transcurre desde el momento de separar las muestras de la ebullición hasta la lectura de la densidad óptica en el colorímetro.

Para ello utilizamos las fórmulas A, B y C antes expuestas.

Las muestras se envasaron en cajas de plástico abiertas y guardaron

en estufa a 34° C durante 48 horas. Para la colorimetría se pesaron con exactitud unos 2 g de la muestra.

La saponificación se hizo con 50 ml de potasa alcohólica 0,5 N durante 30 minutos y la colorimetría se llevó a efecto con el colorímetro "EEL" usando filtro verde.

Los resultados obtenidos fueron :

Tiempo en minuto;	A	B	C
	do Temp.	do Temp.	do Temp.
1	2,5 60°	4 57°	3,5 62°
1,5	3 60°	4,5 57°	4 63°
2	3 59°	5 57°	4,5 61°
2,5	3,5 57°	—	5 58°
3	3,5 55°	→ ∞ 50°	5 55°
3,5	3,5 54°		5 53°
4	4 53°		5,5 51°
5	→ ∞ 50°		→ ∞ 50°

De la consideración de estos resultados sacamos en consecuencia :

a) Que las densidades ópticas aumentan a medida que disminuye la temperatura, aumento que no se debe a un incremento de color sino a un aumento de la turbidez, tanto más acentuada cuanto más nos acercamos a la temperatura de solidificación de las grasas sólidas. Luego para grasas y fórmulas complejas con componentes sólidos, debe fijarse el tiempo más adecuado para efectuar la lectura colorimétrica de las densidades ópticas, tiempo que, en el caso de los

ceratos, es alrededor del minuto y medio de separadas las muestras de la ebullición, en cuyo tiempo se llega a un máximo de la densidad óptica para una misma temperatura.

b) En cuanto a los aceites y fórmulas complejas con componentes líquidos aquel tiempo tiene muy escasa influencia ya que, por ser líquidos, no solidifican a las temperaturas de la experiencia y las lecturas de las densidades ópticas hechas al minuto y medio de sacadas las muestras de la ebullición se mantienen fijas y constantes.

## ESTUDIO COMPARATIVO DEL METODO COLORIMETRICO CON LA DETERMINACION DE LOS INDICES DE PEROXIDOS Y DE ACIDEZ PARA SEGUIR EL CURSO DE UN PROCESO DE AUTOXIDACION DE UNA GRASA O ACEITE

Con el fin de comparar los resultados obtenidos empleando el método colorimétrico con los que proporciona la determinación de los índices de

acidez y de peróxidos en un proceso de autoxidación, elegimos una muestra de aceite de almendras dulces y otra del mismo aceite al que adicio-

namos un 10% de ácido oleico, suponiendo además que esta adición confirmaría lo antes dicho, a saber: si en el aumento de color influye la presencia de los ácidos libres o bien si se debe solamente a una reacción entre los productos engendrados en la autoxidación en presencia de la solución alcohólica de potasa.

Las muestras se colocaron en sendos matraces de 1000 mililitros de capacidad, perfectamente limpios y fueron sometidas a una oxidación acelerada, empleándose a tal fin un tren de aireación adecuado, haciendo burbujear el oxígeno en el aceite manteniendo los matraces a baño de maría.

Se sacaron muestras de cada matraz y con ellas se hicieron tres determinaciones concordantes para cada uno de los índices de acidez y de peróxidos y se determinó también la

densidad óptica (espectrofotómetro "UNICAM" núm. 7.432, longitud de onda 480 milimicras).

Una observación curiosa que queremos hacer constar es que en un descuido en que quedó el baño maría seco, en la muestra de aceite de almendras adicionada de ácido oleico, apareció el color rojo ladrillo característico de las muestras saponificadas con potasa alcohólica, color que en días sucesivos fue desapareciendo. El hecho puede explicarse ya que son suficientes trazas de alcalinidad para que se inicie la aldolización, crotonización y resinificación de los aldehídos, reacciones que a su vez favoreció la elevada temperatura.

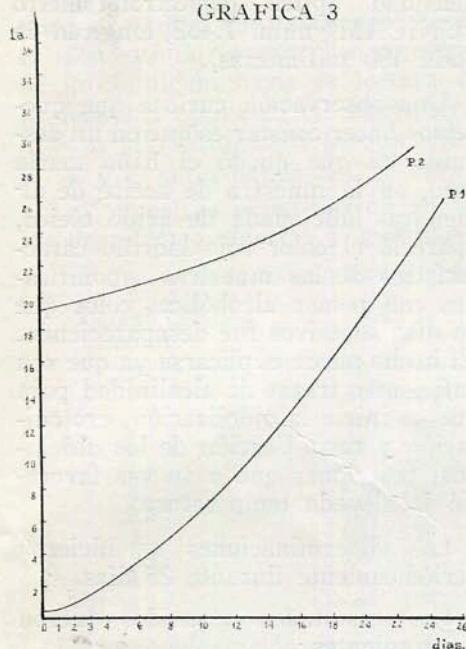
Las determinaciones se hicieron periódicamente durante 25 días.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Días	Aceite de almendras dulces			Aceite de almendras dulces + 10% de ácido oleico		
	I.a.	I.per.	do	I.a.	I.per	do
0	0,32	1,26	5,81	19,20	1,96	5,14
1/2	0,40	1,37	6,21	19,26	2,34	5,52
1	0,41	4,43	11,43	19,13	32,80	32,59
2	0,79	33,12	23,99	20,90	39,04	41,31
3	1,51	53,85	31,71	19,85	39,00	47,47
4	1,84	61,92	32,10	20,33	39,35	49,90
5	2,99	63,87	35,63	20,83	30,45	58,11
5	4,69	64,46	43,35	21,00	11,43	71,35
7	5,95	63,87	50,89	21,48	17,27	80,57
8	6,18	72,47	57,34	21,64	70,14	59,59
9	6,84	82,55	56,23	22,03	30,82	78,73
10	8,87	69,41	61,41	22,69	33,01	94,20
11	9,10	72,70	64,79	22,87	6,22	89,11
(*) 12	9,23	79,94	63,46	22,67	8,20	87,26
13	9,44	80,96	69,05	22,84	9,91	92,91
15	13,13	55,26	72,35	24,22	13,74	89,30
17	14,05	57,09	78,54	24,63	18,48	93,83
19	18,17	50,12	87,88	26,45	22,05	100,93
21	20,91	43,78	94,13	28,40	21,34	103,52
23	22,91	42,91	99,12	28,48	3,45	109,01
25	25,08	46,61	100,37	29,09	13,29	108,49

(\*) En el día 12 las muestras comenzaron a oler a rancio.

GRAFICA 3



Si consideramos los resultados obtenidos observamos que el índice de acidez aumenta de forma gradual, aunque lenta, a medida que progresa el enranciamiento, circunstancia totalmente lógica.

No es consecuente sin embargo, la consideración que puede deducirse de la comparación de los índices de acidez de ambas muestras (Gráfica 3); la de aceite de almendras naturales acusó, en el día 0, un índice de acidez de 0,32 mientras que la de aceite de almendras dulces adicionada de un 10% de ácido oleico en el mismo día, ofreció un índice de acidez de 19,20. La diferencia entre ambos índices:  $19,20 - 0,32 = 18,88$  representará el índice de acidez atribuible al ácido oleico añadido y en efecto concuerda con los cálculos, ya que  $I.a = 18,88$  corresponde aproximadamente a una adición de un 10%

de ácido oleico:  $18,88 \times 0,503 = 9,49\%$  de ácido oleico.

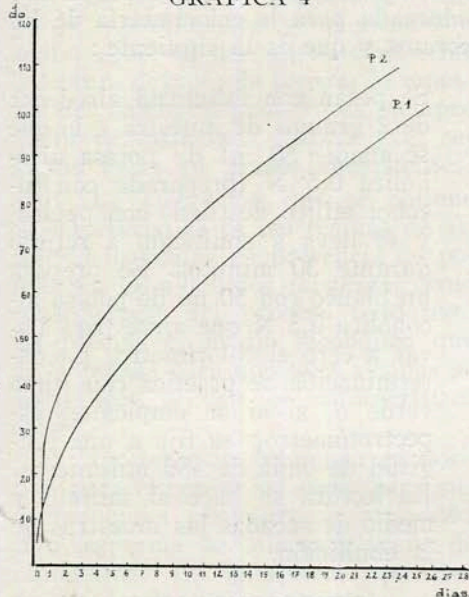
Si consideramos los índices de acidez que acusaron ambas muestras en el día 25 y los comparamos con los determinados en el día 0 vemos que la diferencia entre ambos en la muestra adicionada de ácido oleico es de sólo 9,89 unidades mientras que en la muestra de aceite natural esta diferencia se eleva a 24,76 unidades. En el día 0 la diferencia entre los índices de ambas muestras es de 18,88 mientras que en el día 25 la misma diferencia es sólo de 4,01. (Las gráficas correspondientes resultan convergentes). Ello hace sospechar que el ácido oleico añadido actuó como catalizador negativo en la producción de ácidos libres durante el proceso de autoxidación, lo que no implica que no se produjera el enranciamiento en la muestra adicionada de ácido oleico, puesto que tanto el índice de peróxidos como, sobre todo, la densidad óptica lo detectan y las características organolépticas que ofrecía la muestra en el día 25 (acusada viscosidad y olor fuerte a rancio) lo confirman sin lugar a dudas.

El índice de peróxidos de la muestra adicionada de ácido oleico presenta unas irregularidades que no concuerdan con la literatura. En efecto: en el día 8 se aprecia un máximo y otro en el 15. Alrededor de estas mismas fechas se aprecian también irregularidades en las lecturas de las densidades ópticas que bajan en los días 8 y 15, en principio no explicables. Parece que el ácido oleico adicionado perturba, en algunos casos, la marcha normal de estas reacciones.

Sin embargo, en líneas generales (Gráfica 4) se aprecia que las densidades ópticas aumentan de manera prácticamente paralela lo que por sí

solo es ventaja apreciable a favor del método para seguir un proceso de autoxidación.

GRAFICA 4



Si llevamos a unos ejes coordenados los valores obtenidos con la muestra de aceite de almendras dulces natural obtenemos la gráfica 5.

De la consideración de la misma deducimos:

- Que el índice de acidez aumenta gradualmente durante los 25 días de la experiencia.
- Que lo mismo sucede con la densidad óptica.
- Que las variaciones en los valores correspondientes a índice de acidez a lo largo del período de estudio son menos acentuadas, y por tanto

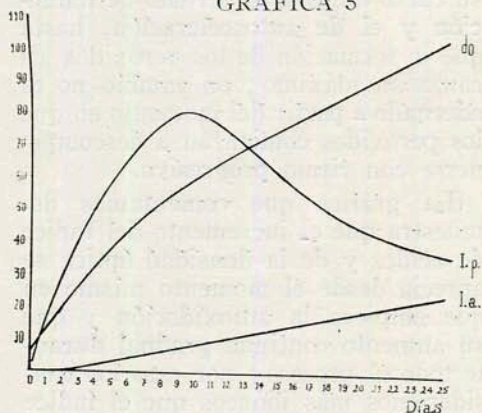
menos significativas, que las existentes en las densidades ópticas.

d) Que el índice de peróxidos, de acuerdo con la literatura, presenta perfectamente definidos los períodos de inducción, autoaceleración, y descomposición de los peróxidos.

De la consideración de la curva de peróxidos sacamos en conclusión que, con su determinación podemos seguir, hasta cierto momento el proceso y grado de la autoxidación de una grasa o aceite, más no sirve para determinarlos, una vez rebasado el período de autoaceleración, ya que los peróxidos van desapareciendo progresivamente motivo por el cual su índice va siendo cada vez menor a medida que va aumentando el enranciamiento, de lo que se desprende que muestras muy enranciadas tendrán un índice de peróxidos bajo, lo que induce a error en cuanto al grado y al estado de su enranciamiento.

Si a esto añadimos que estamos perfectamente de acuerdo con BRUNER (\*) en cuanto a la inconstancia

GRAFICA 5



(\*) C. Bruner: "Causas de error y su eliminación en la determinación yodométrica del Índice de peróxidos", Tesis doctoral, Madrid 1964.

de dicho índice como expresión de una auténtica "constante química" de las grasas, puesto que "su valor cambiará en cuanto varíe una sola de las circunstancias que intervengan en su obtención y nunca expresará limpia y unívocamente una función definida del proceso que pretende representar" y si tenemos en cuenta, además, que lo mismo puede decirse del índice de yodo, cuyos valores oscilan enormemente si no se controlan rigurosamente las normas de trabajo e incluso si no se determina previamente la cantidad máxima de monobromuro de yodo que cada grasa o aceite puede fijar, hemos de concluir que es conveniente buscar métodos más seguros, y a ser posible, más sencillos, para seguir el curso y determinar el grado de un proceso de autoxidación.

A nuestro entender el índice de peróxidos, determinado ateniéndose siempre "escrupulosamente a las mismas normas de trabajo" (BRUNNER, loc. cit.), permite fijar el grado de autoxidación de una grasa y seguir su curso durante el período de inducción y el de autoaceleración, hasta que la formación de los peróxidos alcanza su máximo; en cambio no es adecuado a partir del momento en que los peróxidos comienzan a descomponerse con ritmo progresivo.

La gráfica que comentamos demuestra que el incremento del índice de acidez y de la densidad óptica se aprecia desde el momento mismo en que empieza la autoxidación y que su aumento continua gradual durante todo el proceso; por esto los consideramos más idóneos que el índice de peróxidos, no sólo para seguir el curso, sino para determinar el grado de autoxidación ya que acidez, densidad óptica y enranciamiento aumentan paralela y proporcionalmente.

Aparte suman la ventaja de su extremada sencillez.

La consideración conjunta de todo lo expuesto nos ha permitido elaborar una técnica, que consideramos la más adecuada para la colorimetría de los ceratos y que es la siguiente:

Se pesan con exactitud alrededor de 2 gramos de muestra a la que se añaden 50 ml de potasa alcohólica 0,5 N (preparada con alcohol etílico destilado con potasa) y se lleva a ebullición a reflujó durante 30 minutos. Se prepara un blanco con 50 ml de potasa alcohólica 0,5 N que sirve para llevar a cero el colorímetro. La determinación se practica con filtro verde o, si se emplea el espectrotómetro, se fija a una longitud de onda de 480 milimicras. La lectura se hace al minuto y medio de sacadas las muestras de la ebullición.

## CONCLUSIONES

*Se establece una técnica colorimétrica original para determinar el grado de enranciamiento de una grasa que permite seguir un proceso de autoxidación ventajosamente en comparación con las técnicas hasta hoy empleadas y sin que se hayan demostrado interferencias por el momento.*

Para llegar a esta conclusión se han establecido previamente las siguientes conclusiones parciales:

- a) El grado de enranciamiento influye de manera acusada en la intensidad de color obtenido al saponificar con potasa alcohólica grasas enranciadas, intensidad que cumple con la Ley de Beer para muestras de peso comprendido entre uno y dos gramos.
- b) Se demuestra la conveniencia

de utilizar 50 mililitros de potasa alcohólica 0,5 N en los casos concretos y para los ceratos una longitud de onda de 448 milimicras.

c) Se fija en 30 minutos el tiempo de saponificación y en minuto y medio aquel en que ha de efectuarse la lectura después de separar la muestra del baño; el primero es siempre factor de influencia notoria y el segundo lo es en grasas consistentes.

d) La coloración que se obtiene es característica de las resinas de aldehído formadas en presencia de potasa por los aldehídos existentes como consecuencia del proceso oxidativo. Es preciso el medio alcohólico que da la potasa para que tales resinas se solubilicen y den el característico color.

e) La reacción coloreada es positiva para el cerato así como para sus componentes céreo-grasos aislados: cera, esperma de ballena y aceite de almendras. Es igualmente positiva para todos los aceites vegetales ensayados y para la manteca de cerdo.

f) La adición de ácido oleico a aceite de almendras actúa en el proceso autoxidativo como catalizador negativo en la formación de ácidos libres sin que entorpezca la marcha de dicho proceso como lo demuestran los caracteres organolépticos, índice de peróxidos y densidad óptica.

g) Los valores correspondientes a la densidad óptica en el curso de un proceso autoxidativo aumenta de manera regular con el tiempo, de forma más acusada que el índice de acidez y sin interferirlos la adición de ácidos grasos y también de forma mucho más acusada que el índice de saponificación con el que no guarda paralelismo, por lo que el método colorimétrico ha de reputarse ventajoso frente a la determinación de los mencionados índices. También lo es compartivamente con la determinación del índice de peróxidos que sólo es de valor para seguir la marcha del proceso en sus primeras fases pero no una vez superado el período de autoaceleración.