

39B
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE ME

FACULTAD DE QUIMICA

**OBTENCION DE ANTIOXIDANTES NATURALES A PARTIR
DE ROMERO Y SU APLICACION EN ALIMENTOS**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
PABLO KURI BREÑA ROMERO DE TERREROS

MEXICO, D. F.

1988



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

- 1) OBJETIVO
- 2) INTRODUCCION
- 3) GENERALIDADES
 - 3.1) QUIMICA BASICA DE GRASAS Y ACEITES
 - 3.2) DETERIORO DE LOS LIPIDOS
 - 3.2.1) RANCIDEZ HIDROLITICA O LIPOLISIS
 - 3.2.2) RANCIDEZ OXIDATIVA
 - 3.2.2.1) AUTOXIDACION
 - 3.2.2.2) OXIDACION POR LIPOXIGENASAS
 - 3.2.3) REVERSION
 - 3.3) ANTIOXIDANTES ARTIFICIALES
 - 3.3.1) BUTILHIDROXIANISOL (BHA)
 - 3.3.2) BUTILHIDROXITOLUENO (BHT)
 - 3.3.3) GALATOS DE ALQUILIO
 - 3.3.4) 2,5-DITERBUTILHIDROQUINONA (TBHQ)
 - 3.3.5) 4-HIDROXIMETIL-2,6-DITERBUTILFENOL
 - 3.3.6) ACIDO NORDIHDRIDO GUAYARETICO (NDGA)
 - 3.4) ANTIOXIDANTES NATURALES
 - 3.4.1) AMINOACIDOS Y PROTEINAS
 - 3.4.2) TOCOFEROLES Y ACIDO ASCORBICO
 - 3.4.3) COMPUESTOS FENOLICOS
 - 3.4.4) PROPIEDADES ANTIOXIDANTES DE DIFERENTES ESPECIAS

- 3.4.5) ANTIOXIDANTES NATURALES DEL ROMERO
- 3.5) MECANISMO DE ACCION DE LOS ANTIOXIDANTES.
- 4) LEGISLACIONES GUBERNAMENTALES PARA EL USO DE ANTIOXIDANTES EN ALIMENTOS.
- 5) ALGUNOS METODOS PARA DETERMINAR EL GRADO DE OXIDACION DE LOS LIPIDOS
 - 5.1) EVALUACION SENSORIAL
 - 5.2) METODOS QUIMICOS
 - 5.2.1) INDICE DE PEROXIDOS
 - 5.2.2) PRUEBA DEL ACIDO TIOBARBITURICO (TBA)
 - 5.2.3) PRUEBA DE KREIS
 - 5.2.4) COMPUESTOS CARBONILICOS VOLATILES Y TOTALES
 - 5.3) METODOS FISICOS
 - 5.3.1) METODO DE DIENOS CONJUGADOS
 - 5.3.2) ESPECTROSCOPIA INFRARROJA
 - 5.3.3) POLAROGRAFIA
 - 5.3.4) CROMATOGRAFIA DE GASES
- 6) DESARROLLO EXPERIMENTAL
 - 6.1) OBTENCION DEL EXTRACTO DE ANTIOXIDANTES NATURALES A PARTIR DEL ROMERO (Rosmarinus officinalis)
 - 6.2) SEPARACION DE UN COMPUESTO CON POSIBLE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO DE ROMERO

6.3) APLICACION DEL EXTRACTO DE ANTIOXIDANTES
NATURALES Y DEL COMPUESTO AISLADO A SISTEMAS
ALIMENTICIOS

6.3.1) EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL
EXTRACTO DE ROMERO Y DEL COMPUESTO AISLADO

7) RESULTADOS

7.1) RENDIMIENTOS LOGRADOS AL OBTENER EL EXTRACTO
DE ANTIOXIDANTES NATURALES Y EL COMPUESTO
PURIFICADO

7.2) GRAFICAS DE INDICE DE PEROXIDOS VS. TIEMPO Y
SUSTANCIAS REACTANTES CON TBA VS. TIEMPO

7.3) CALCULO DE LAS CONSTANTES DE DEGRADACION "K"
PARA LOS DIFERENTES ANTIOXIDANTES EMPLEADOS

7.4) CALCULO DE LOS FACTORES DE CALIDAD "Q₁₀" PARA
EL ACEITE DE SOYA CON LOS DIFERENTES
ANTIOXIDANTES EMPLEADOS

8) ANALISIS DE RESULTADOS

9) CONCLUSIONES

10) BIBLIOGRAFIA

1) OBJETIVO

El presente trabajo tiene como finalidad la obtención de antioxidantes naturales a partir del romero y su aplicación a sistemas alimenticios, así como comparar su actividad con los antioxidantes artificiales butilhidroxianisol (BHA) y butilhidroxitolueno (BHT).

I) INTRODUCCION.

Aunque los principales componentes de los alimentos como las proteínas, grasas y carbohidratos están sujetos a diferentes tipos de oxidación que ocurren en forma simultánea, el presente trabajo se enfoca al deterioro oxidativo que sufren las grasas y constituyentes grasos de los alimentos.

La oxidación de grasas y aceites comestibles es un proceso inevitable que comienza desde el momento en que el lípido es extraído de la célula animal o vegetal de la cual proviene, y su rapidez, varía de acuerdo a la estructura química del lípido, de su contenido natural de antioxidantes y de las condiciones de luz, calor y humedad a la que es sometido. Como consecuencia de este proceso oxidativo, se pierden elementos nutricionales importantes constituidos por las vitaminas y provitaminas liposolubles además de los lípidos poliinsaturados; y aparece el atributo sensorial conocido como rancidez, que es descrito como los olores y sabores desagradables ocasionados por la acumulación de los productos de descomposición de los lípidos (7).

Los antioxidantes (1), son aditivos que están presentes en un producto alimenticio como resultado de su adición premeditada, con el fin de controlar la oxidación de los lípidos y consecuentemente conservar sus propiedades sensoriales y nutricionales durante un periodo de tiempo mayor; sin embargo, no deben enmascarar grasas o alimentos grasos que se hubieran deteriorado por mantenerlos bajo malas condiciones de almacenamiento.

Un buen antioxidante, debe tener una baja toxicidad y ser potente en una gran variedad de lípidos sin impartir color, olor o sabor al producto alimenticio; el éxito de su aplicación (13), requiere del conocimiento de la química básica de grasas y aceites, del mecanismo de su oxidación, así como del funcionamiento del antioxidante que permite retardar este tipo de deterioro.

3) GENERALIDADES

3.1) QUIMICA BASICA DE GRASAS Y ACEITES

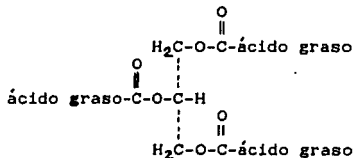
La distinción genérica que existe entre un aceite y una grasa, es que los aceites son líquidos a temperatura ambiente, mientras que las grasas son sólidas. Esta distinción es muy relativa, ya que la "temperatura ambiente" varía mucho entre los distintos países y zonas geográficas. Generalmente, los aceites son de origen vegetal, mientras que las grasas son de origen animal (1,13).

Los lípidos se clasifican de una manera general en (12):

1) Lípidos simples:

Son ésteres de ácidos grasos con alcoholes.

a) Grasas: ésteres de ácidos grasos con glicerol.



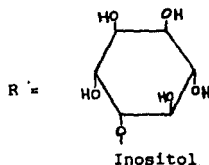
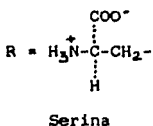
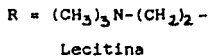
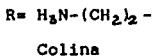
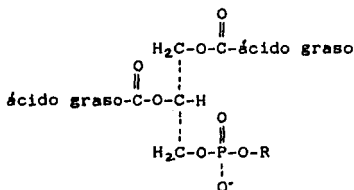
b) Ceras: ésteres de ácidos grasos con un alcohol diferente del glicerol.



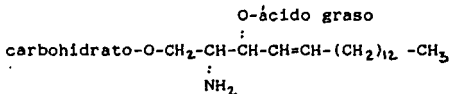
2) Lípidos compuestos

Son lípidos que incluyen otros compuestos además del éster del ácido graso con el alcohol.

a) Fosfolípidos o fosfátidos: ésteres que contienen ácidos grasos, ácido fosfórico y otros grupos que usualmente contienen nitrógeno.



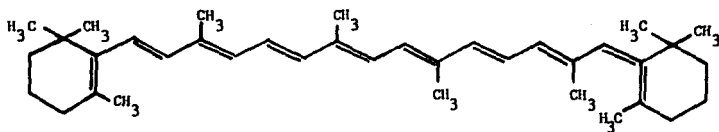
b) Cerebrósidos (glicolípidos): compuestos que contienen ácidos grasos, un carbohidrato y esfingosina pero no contienen ácido fosfórico.



c) Lipoproteínas: Compuestos de lípidos y proteínas.

d) Pigmentos liposolubles

Existe una información considerable acerca de las diferentes clases de pigmentos que existen en los alimentos; sin embargo, los carotenoides son los representantes típicos de pigmentos liposolubles. Estos constan de una estructura básica formada por la condensación de moléculas de isopreno.



β -Caroteno

e) Hidrocarburos.

Son compuestos que solo contienen carbono e hidrógeno en su estructura molecular.

Otra manera de clasificar los lípidos es de acuerdo al tipo de ácidos grasos que contienen; de esta manera, existen 5 grupos bien definidos (12):

1) Grupo de las grasas lácteas:

Los lípidos de este grupo contienen del 40 al 50% de ácido oleico, del 25 al 32% de ácido palmítico, del 10 al 15% de ácido esteárico y del 3 al 15% de ácido butírico, aunque esta composición varía de acuerdo a la dieta del animal.

La leche de los rumiantes, y particularmente la de la vaca,

son los alimentos mas representativos de este grupo.

2) Grupo del ácido láurico:

Los lípidos de este grupo contienen del 40 al 50% de ácido láurico además de cantidades menores de los ácidos caprílico, cáprico, mirístico, palmítico y esteárico.

Debido a que no contienen ácidos grasos insaturados, los lípidos que pertenecen a este grupo poseen una larga vida de anaquel.

Los lípidos más representativos de este grupo son el aceite de la semilla de palma y el de coco.

3) Grupo del ácido oleico-linoleico.

Este grupo es el más amplio y variado, perteneciendo a él los aceites de origen vegetal exclusivamente. Los lípidos de este grupo contienen menos del 20% de ácidos grasos saturados; y de los insaturados, predominan los ácidos oleico y linoleico.

Algunos ejemplos de lípidos que pertenecen a este grupo son: aceites derivados de la cubierta de las semillas o de la pulpa del fruto como los de oliva y palma.

4) Grupo del ácido linolénico.

Este grupo se caracteriza porque los lípidos que pertenecen a él contienen, en mayor proporción, el ácido linolénico; sin embargo, también contienen cantidades elevadas de los ácidos oleico y linoleico.

El aceite comestible más importante de este grupo es el de la soya, aunque también existen el del germen de trigo y linaza.

5) Grupo de las grasas animales.

Los lípidos de este grupo contienen del 30 al 40% los ácidos palmítico y esteárico, y el 60% de los ácidos oleico y linoleico.

Los representantes típicos de este grupo son las grasas de cerdo, de ovinos y bovinos.

ACIDOS GRASOS SATURADOS (1)

NOMBRE TRIVIAL	NOMBRE CIENTIFICO	FORMULA
Butírico	Butanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$
Caproico	Hexanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$
Caprílico	Octanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$
Cáprico	Decanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{COOH}$
Láurico	Dodecanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$
Mirístico	Tetradecanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$
Palmítico	Hexadecanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$
Estearico	Octadecanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$
Araquídico	Eicosanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$

ACIDOS GRASOS INSATURADOS (1)

NOMBRE TRIVIAL	NOMBRE CIENTIFICO	FORMULA
Palmitoleico	Hexadeca-9-enoico	$\text{C}_{15}\text{H}_{31}\text{COOH}$
Oleico	Octadeca-9-enoico	$\text{C}_{17}\text{H}_{33}\text{COOH}$
Linoleico	Octadeca-9:12-dienoico	$\text{C}_{17}\text{H}_{31}\text{COOH}$
Linolénico	Octadeca-9:12:15-trienoico	$\text{C}_{17}\text{H}_{29}\text{COOH}$
Araquidónico	Eicosa-5:8:11:14-teraenoico	$\text{C}_{19}\text{H}_{35}\text{COOH}$
Vaccenoico	Octadeca-11-enoico	$\text{C}_{17}\text{H}_{33}\text{COOH}$

3.2) DETERIORO DE LOS LIPIDOS.

Las grasas y los aceites son susceptibles a diferentes reacciones de deterioro que reducen el valor nutritivo del alimento, y además, producen compuestos volátiles que imparten olores y sabores desagradables. Esto se debe a que el enlace éster de los acilglicéridos es susceptible a la hidrólisis química o enzimática, y a que los ácidos grasos insaturados son sensibles a reacciones de oxidación (1).

El deterioro de los lípidos se ha dividido en 3 grupos de reacciones:

- Rancidez hidrolítica o lipólisis.
- Rancidez oxidativa.
- Reversión.

3.2.1.) RANCIDEZ HIDROLITICA O LIPOLISIS.

Este tipo de rancidez, se debe a la acción de enzimas lipolíticas sobre los enlaces éster de los triacilglicéridos de las grasas, liberando así, ácidos grasos y glicerol que se caracterizan por producir un sabor "jabonoso". Es muy notable en alimentos que contienen altas concentraciones de ácidos volátiles de cadena corta ($C_4 - C_{12}$) como los productos lácteos. Sin embargo, en alimentos con ácidos grasos de cadena larga, (que son

la mayoría de las grasas y aceites de la industria alimentaria), no se percibe la rancidez hidrolítica aún cuando exista actividad de la enzima.

La fuente y el origen de las enzimas puede ser el propio alimento o bien una contaminación microbiana por levaduras, hongos o bacterias (1).

3.2.2) RANCIDEZ OXIDATIVA

Las reacciones de oxidación de los lípidos se dividen en dos grupos principales (1):

- Acción directa del oxígeno sobre las dobles ligaduras de los ácidos grasos insaturados (autooxidación).

- Acción enzimática de la lipoxigenasa y de la alcohol deshidrogenasa.

3.2.2.1) AUTOXIDACION.

A su vez, la autooxidación de los lípidos se ha dividido en 2 áreas generales (13):

1) La oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados que dan productos polimerizados; y

2) La oxidación de los ácidos grasos moderadamente

insaturados que producen compuestos volátiles impartiendo olores y sabores desagradables además de otros fenómenos como la reversión del sabor.

Sin embargo, los ácidos grasos insaturados no son los únicos constituyentes de los alimentos que se oxidan; los componentes que le imparten olor, color y sabor como los pigmentos, fosfátidos y aceites esenciales, de igual manera que algunas vitaminas, también son propensas a la oxidación. El común denominador de todas estas sustancias es la presencia de dobles ligaduras en su estructura química (1).

La intensidad y la forma de oxidación, así como los compuestos que se producen dependen, en gran parte, de las condiciones de oxidación como la temperatura, presencia de catalizadores, estado de dispersión de la grasa, tipo de ácido graso, distribución y geometría de la doble ligadura y cantidad de oxígeno disponible (13,1).

De igual manera, la cantidad de agua de los alimentos desempeña un papel muy importante en la velocidad de oxidación de los ácidos grasos; Patton describe un sabor "acartonado" desarrollado por la oxidación de lípidos en un sistema acuoso, mientras que en un sistema con baja actividad acuosa como la leche deshidratada, se desarrolla un sabor "aceitoso o saboso". Por otro lado, cuando los componentes de la mantequilla sufren reacciones de oxidación, adquiere sabores "acartonados", "sebosos" o "a pescado" (13).

El ácido linoleico es el principal ácido graso poliinsaturado de las grasas comerciales, por lo que el mecanismo de la reacción de oxidación se encontró a partir de sistemas modelo empleando éste ácido graso (13,1).

La oxidación de los lípidos es autocatalítica y tiene la característica de ser una reacción en cadena que consta esencialmente de tres pasos: iniciación, propagación y terminación (13,1).

INICIACION

Durante esta etapa, se sustrae uno de los átomos de hidrógeno adyacentes a la doble ligadura (fig. 1), formandose un radical libre al cual el oxígeno se puede unir fácilmente.

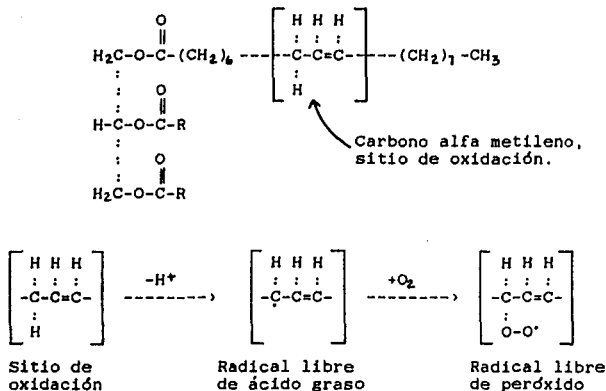


Figura 1.- Reacción de iniciación.

La reacción de iniciación es catalizada principalmente por la presencia de metales, oxígeno, luz y temperatura, aunque cuando el oxígeno tiene una configuración electrónica de singulete, puede unirse directamente al ácido insaturado sin la previa formación de radicales libres; produciendose así los correspondientes hidroperóxidos.

PROPAGACION

El radical hidroperóxido reacciona con nuevos ácidos grasos, formando más radicales libres con lo cual se propaga la reacción (fig. 2).

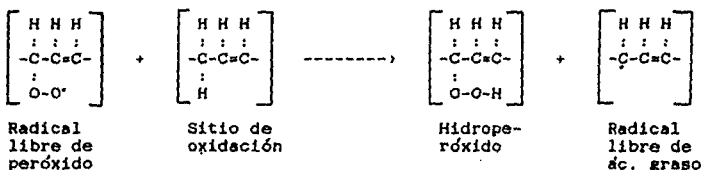


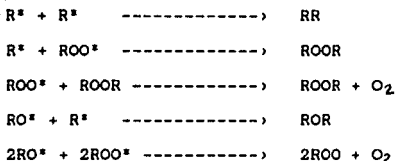
Figura 2.- Reacción de propagación.

TERMINACION

El paso final de las reacciones de oxidación se efectúa a través de reacciones de condensación formando compuestos muy estables; por tanto, termina cuando ya no existen radicales libres activos (Tabla I).

T A B L A I.

REACCIONES DE TERMINACION



R[•] = Radical libre de ácido graso.

ROO[•] = Radical libre de peróxido.

Las reacciones de descomposición de los hidroperóxidos formados en la etapa de propagación producen diferentes compuestos como peróxidos, aldehídos, cetonas, ácidos, epóxidos, polímeros y cetoglicéridos; algunos de los cuales, son los responsables de las propiedades sensoriales de las grasas oxidadas (Tabla II) (1).

Además de su descomposición, los peróxidos tienen la capacidad de interactuar con otros constituyentes de los alimentos como proteínas y pigmentos, reduciendo así su valor nutritivo y generando sustancias cuya naturaleza química puede ser dañina para la salud del hombre (1).

En general, durante la autoxidación de los lípidos (13):

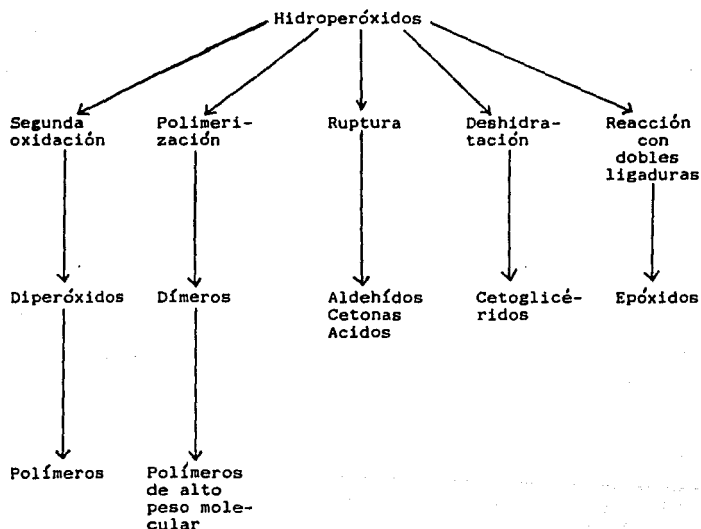
1) Los productos primarios son insípidos e inodoros.

2) A altas temperaturas y/o niveles de oxidación, se forman varios compuestos no volátiles que son inodoros pero que imparten sabor desagradable.

3) Posteriormente, se forman aldehídos, cetonas y otros compuestos volátiles de cadena corta que ocasionan olores y sabores desagradables muy intensos.

T A B L A II.

REACCIONES DE DESCOMPOSICION DE LOS HIDROPEROXIDOS



3.2.2.2) OXIDACION POR LIPOXIGENASAS.

Las enzimas efectúan una oxigenación en lugar de una oxidación, adicionando dos átomos de oxígeno a cada molécula de ácido graso, con lo que se forman hidroperóxidos cis-trans ópticamente activos (fig. 3) que causan los mismos problemas y tienen mecanismos de reacción semejantes a los descritos en la autooxidación. Los sustratos específicos de las enzimas son ácidos grasos insaturados que contienen como mínimo, una unidad de cis-cis-1,4 pentadieno (-CH=CH-CH₂-CH=CH-). La enzima no actúa sobre los ácidos grasos con sistemas conjugados de insaturación, ni en ácidos con dobles ligaduras en posición trans (1).

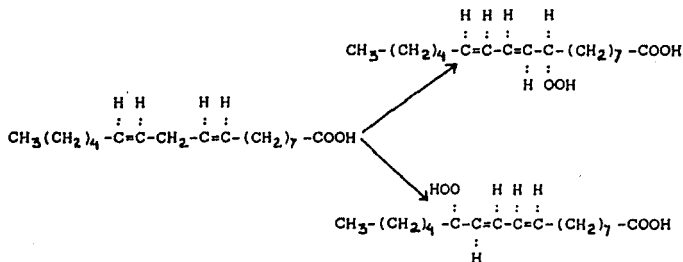


Figura 3.- Acción de las enzimas lipoxigenasas.

3.2.3) REVERSION

Es un fenómeno que no está muy relacionado con la oxidación de los lípidos, pues sucede aun en productos con bajo índice de peróxidos y, además, el olor producido es diferente al de las grasas rancias. Los olores y sabores producidos por el fenómeno

de reversión se describen como "a semillas", "a pintura" y finalmente "a pescado".

Entre los compuestos producidos durante este fenómeno se han aislado el de diacetilo, el 2n-pentilfurano, el aldehído málico, el acetaldehído, el 2,4-pentadieno y otros.

Parece ser que el ácido linoleico es el mayor precursor de la reversión de los aceites; sin embargo, el mecanismo de la reacción no es totalmente conocido. Se sabe que algunos factores como la temperatura, ciertos iones metálicos y algunas radiaciones electromagnéticas la aceleran; mientras que la presencia de oxígeno, no tiene mucha influencia (1).

3.3) ANTIOXIDANTES ARTIFICIALES.

La mayoría de los antioxidantes artificiales usados comunmente en la industria alimentaria, están constituidos por un anillo aromático insaturado y grupos hidroxilo que funcionan como donadores de electrones o átomos de hidrógeno (1,13). La potencia de cualquiera de estos aditivos se puede alterar si se modifica su estructura química añadiendo ciertos grupos activos dentro del nucleo aromático; por ejemplo, la sustitución de grupos alquilo en la posición orto o para, aumenta su capacidad antioxidante (1) y provocan que sean menos volátiles y mas solubles en grasas y aceites (13); sin embargo, es muy importante tomar en cuenta la longitud y ramificación de la cadena de átomos de carbono usados como sustituyentes del grupo aromático, pues si estos son

demasiado grandes, provocarán un impedimento estérico hasta el punto en que el aditivo no sea efectivo en contra de la oxidación (13).

Las características físicas como la solubilidad, punto de ebullición y peso molecular de cada antioxidante artificial, se encuentra reportado en el "Codex de Aditivos para Alimentos" ("Food Chemicals Codex"), pero a continuación se especifican las más relevantes:

3.3.1) BUTILHIDROXIANISOL (BHA)

El antioxidante artificial BHA contiene un grupo hidroxilo y un grupo terbutilo (fig.4) que ocasiona su relativa no polaridad. Este antioxidante es poco eficiente en aceites vegetales debido al impedimento estérico que ocasiona el grupo alquilo; pero gracias a él, funciona de una manera muy eficiente en grasas animales.

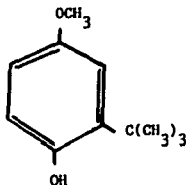


Figura 4.- butilhidroxianisol (BHA).
3-terbutil-4-hidroxianisol.

El BHA tiene un olor fenólico muy fuerte que es

particularmente detectable a temperaturas elevadas como en el caso del proceso de freído, en donde hay una pérdida substancial del antioxidante y en consecuencia, la pequeña actividad que ofrece en los aceites vegetales se pierde (14).

3.3.2) BUTILHIDROXITOLUENO (BHT)

El antioxidante artificial BHT, por su estructura química (fig. 5), es sumamente débil como estabilizante de aceites vegetales pues, al igual que el BHA, fué desarrollado originalmente para usarlo en grasas animales en las que proporciona una excelente actividad (14).

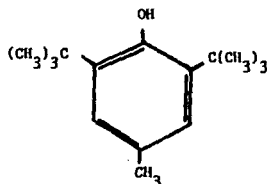


Figura 5.- butilhidroxitolueno (BHT).
2-6-diterbutil-4-metilfenol.

3.3.3.) GALATOS DE ALQUILO

Debido a que el ácido gálico contiene tres grupos hidroxilo (Fig. 6) es un potente antioxidante, sin embargo, posee una alta solubilidad en agua y en consecuencia, tiende a migrar hacia la fase acuosa de cualquier sistema alimenticio que lo posea. Comunmente, se emplean los galatos de alquilo como el propíl galato (Fig. 7) el cual, tiene los inconvenientes de que forma un

complejo de color negro con las sales de hierro y es muy sensible a las temperaturas elevadas, por lo que es inefectivo en los productos horneados y en el proceso de freído.

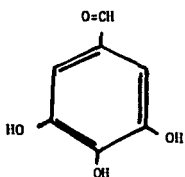


Figura 6 .- Acido Gálico

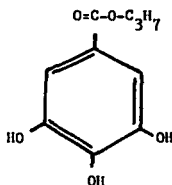


Figura 7. - Propil Galato

Los galatos que poseen un grupo alquilo muy largo, como el galato de octilo (Fig. 8) y el galato de laurilo (Fig. 9) son más solubles en grasas (14).

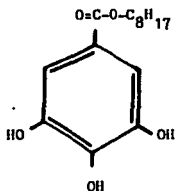


Figura 8 .- Galato de Octilo

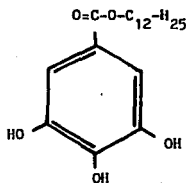


Figura 9 .- Galato de Laurilo

3.3.4) 2,5 - DITERBUTILHIDROQUINONA (TBHQ)

El antioxidante artificial TBHQ (Fig. 10) fué aprobado para aplicarlo en alimentos en el año de 1972 en los Estados Unidos.

Este aditivo ofrece una mayor protección que el propil galato; especialmente en aceites poliinsaturados como en los de girasol y los de cártamo, no sufre decoloración en presencia de sales de hierro y su solubilidad en grasas es buena (14).

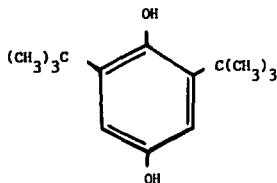


Figura. 10 .- 2,5- Diterbutilhidroquinona (TBHQ)

3.3.5) 4-HIDROXIMETIL-2,6-DITERBUTIL FENOL.

Este antioxidante artificial tiene una estructura química muy similar al BHT, con la diferencia de que incluye un grupo hidroximetilo en lugar de un grupo metilo (Fig. 11). El objetivo de esta nueva estructura era disminuir su volatilidad y de esta manera, estabilizar aceites vegetales durante el freído; sin embargo, este pequeño cambio en la estructura química disminuyó considerablemente su actividad antioxidante y en consecuencia este aditivo no se usa en forma comercial (14).

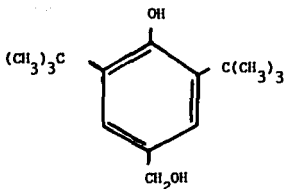


Figura. 11 .- 4-Hidroxiometil-2,6-Diterbutil fenol

3.3.6) ACIDO NORDIHDRIDO GUAYARETICO (NDGA)

Este antioxidante artificial (fig.12), al igual que el propil galato, presenta el serio inconveniente de que forma compuestos coloridos con sales de hierro y además no es efectivo en productos horneados o fritos debido a su inestabilidad a temperaturas elevadas (14).

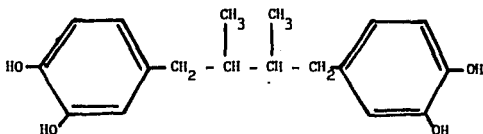


Figura 12.- Acido Nordihidrido Guayaretico (NDGA).
4,4-(2,3-Dimetiltetrametileno) Dipirocatecol

3.4) ANTIOXIDANTES NATURALES.

Los antioxidantes usados comunmente son sintéticos, y la posibilidad de sus efectos toxicológicos ha sido tema de estudio en los últimos años (4). Se ha demostrado que los antioxidantes

butilhidroxianisol (BHA) y butilhidroxitolueno (BHT) son inofensivos a niveles de hasta 50 mg/kg/día que es 500 veces la cantidad consumida por el hombre, siendo la dosis letal media para ambos de 2000 mg/kg (2); sin embargo, a concentraciones altas (500 mg/kg/día) tanto BHA como BHT ocasionan alteraciones enzimáticas patológicas en el hígado y en otras zonas como la mucosa del tracto gastrointestinal (4,25). Por ejemplo, BHA causa un decremento de la actividad de la enzima glucosa-6-fosfatasa y citocromo oxidasa (2).

Por tales razones, el antioxidante BHT fué eliminado durante algún tiempo de la lista de aditivos reconocidos como seguros (lista GRAS "Generally Recognized as Safe") de la Asociación FDA ("Food and Drug Administration") (25), mientras que en Japón se está discutiendo la posibilidad de prohibir el uso del antioxidante BHA en los alimentos (11). Además, los antioxidantes artificiales tienen algunas limitaciones como su volatilidad, inestabilidad a temperaturas elevadas, restricción a ciertos alimentos y ser inefectivos en contra del fenómeno conocido como reversión del sabor (22).

Todo esto, ha despertado el interés de preparar antioxidantes naturales mediante una extracción, purificación y fraccionación. Ciertamente, no hay una confianza absoluta de que una fracción o un compuesto aislado de un alimento natural sea seguro; sin embargo, si se tiene la seguridad de que un antioxidante obtenido de esta manera es un compuesto natural de

un alimento que ha sido consumido por miles de años y no un compuesto sintético (25).

Los grupos de compuestos naturales que han sido estudiados por sus propiedades antioxidantes son:

- Aminoácidos y proteínas.
- Tocoferoles y ácido ascórbico.
- Compuestos fenólicos.

3.4.1) AMINOACIDOS Y PROTEINAS.

De los aminoácidos, aquellos con mayor actividad antioxidante son los que contienen grupos sulfhidrilo (-SH), pues generalmente los tioles son reconocidos como agentes que bloquean la propagación de radicales libres; sin embargo, se ha demostrado que todos los aminoácidos poseen cierta actividad en algún sistema.

Las posibilidades de aplicación de la cisteína son amplias, pero tiene la desventaja de que su cadena, (-CH₂-SH), al descomponer los hidroperóxidos, forma compuestos carbonílicos que pueden conducir a un oscurecimiento no enzimático del alimento.

Se sabe que ciertas proteínas e hidrolizados proteínicos inhiben la autoxidación de la vitamina A, esta propiedad también ha sido atribuida a la presencia de grupos sulfhidrilo libres (22).

3.4.2) TOCOFEROLES Y ACIDO ASCORBICO.

Los tocoferoles son bien reconocidos como antioxidantes naturales; sin embargo, esta actividad no es la misma para sus diferentes isómeros ya que el gamma-tocoferol es más efectivo que el alfa-tocoferol; además, debido a su larga estructura molecular, que ocasiona un gran impedimento estérico, su actividad antioxidante es débil.

La acción del ácido ascórbico es muy variable, dado que en algunos sistemas actúa como prooxidante y en otros como antioxidante. En general, esta acción está determinada por el potencial de óxido-reducción del sistema, el pH, las condiciones aerobias o anaerobias, la presencia o ausencia de metales, la cantidad de enzimas y el tiempo (22).

3.4.3) COMPUESTOS FENOLICOS.

Se han aislado e identificado algunos compuestos fenólicos como las isoflavonas y derivados del ácido cinámico de semillas de oleaginosas, como la soya, el cacahuate y el algodón que responden a la actividad antioxidante de sus extractos; sin embargo, ciertos flavonoides y derivados del ácido cinámico, sirven como sustrato para un oscurecimiento enzimático y pueden acarrear problemas dentro del marco toxicológico como es el caso del gospól, polifenol abundante de la semilla de algodón.

De igual manera, se han encontrado compuestos fenólicos con actividad antioxidante en el romero, la salvia, el clavo, y en general las especias (22).

3.4.4.) PROPIEDADES ANTIOXIDANTES DE DIFERENTES ESPECIAS.

Debido a que las especias son muy usadas en una gran variedad de productos alimenticios, es importante conocer la capacidad conservadora que imparten; por ejemplo, sus propiedades bactericidas y bacteriostáticas que ayudan a prevenir o retardar la contaminación microbiana en el alimento, así como sus propiedades antioxidantes que ayudan a retardar la rancidez causada por la oxidación de los lípidos (5).

Chipault et. al. en los años 50, realizaron un estudio exhaustivo sobre las propiedades antioxidantes de 32 variedades de especias molidas hasta que traspasaran la malla 100 e incorporándolas a lípidos en concentraciones de 0.2% (5,6); llegando a la conclusión de que el romero y la salvia poseen un efecto antioxidante particularmente pronunciado, por lo que sería conveniente realizar estudios posteriores enfocados en el aislamiento de sus compuestos antioxidantes naturales, tomando en cuenta que:

La salvia contiene por lo menos dos compuestos antioxidantes potentes con propiedades físicas y químicas muy diferentes.

Los antioxidantes predominantes en el romero y la salvia son

solubles en soluciones acuosas alcalinas sugiriendo un carácter ácido (o fenólico).

Las fracciones que contienen los antioxidantes predominantes del romero y la salvia no contienen los compuestos característicos que ocasionan el aroma de las especias.

3.4.3) ANTIOXIDANTES NATURALES DEL ROMERO

El romero (Rosmarinus officinalis) (9) es una especia que pertenece a la familia de las Labiadas; crece en forma de arbusto de 0.5 a 1.0 metros de altura, sus hojas son opuestas, lineares, con bordes arrollados hacia abajo, verdes por el haz y blancas por el envés; sus flores son de color azul pálido con manchas violáceas.

En el año de 1977, Chang et. al. (4) patentaron un proceso para la obtención de antioxidantes naturales mediante una extracción con solventes orgánicos a partir de hojas secas y finamente molidas de romero. En este proceso, el extracto de antioxidantes es sometido a una destilación por arrastre de vapor al vacío para así obtener el mismo extracto pero sin olor y sin sabor.

La actividad antioxidante se demostró tanto en grasas animales como en aceites vegetales, manteniendo incluso la estabilidad del sabor en aceite de soya. También se demostró que este extracto de antioxidantes naturales tiene una menor

volatilidad y una mejor estabilidad a temperaturas elevadas que los antioxidantes artificiales BHA y BHT, de tal manera que puede ser utilizado en alimentos para freír.

En el año de 1964, Brieskorn et. al. (3) aislaron y caracterizaron del romero un diterpeno fenólico llamado "carnosol", encontrando que era el mismo compuesto aislado a partir de la salvia (Salvia officinalis) llamado "picrosalvin" (fig. 13). Además encontraron otros diterpenos relacionados entre sí a los cuales denominaron: "royleanona" (fig. 14), "acetoxiroyleanona" (fig. 15) y "dehidroroyleanona" (fig. 16); sin embargo, no demostraron el efecto antioxidante de ninguno de estos compuestos.

Posteriormente, en 1984, Wu et. al. (25) usando un método de aislamiento diferente también identificaron el compuesto antioxidante carnosol, y demostraron que tanto este como el extracto de antioxidantes en conjunto, tienen una mayor actividad que el antioxidante artificial BHA y comparable con la del BHT cuando se agregaron a una concentración de 0.02% en grasa de cerdo (tablas III y IV). De la misma manera, compararon el efecto antioxidante de 16 subfracciones obtenidas al realizar una cromatografía en columna del extracto de antioxidantes del romero (tabla IV) e identificaron otro compuesto llamado ácido ursólico (fig. 17) que no tiene efecto antioxidante.

En el año de 1981, Inatani et. al. (18) aislaron e identificaron de las hojas del romero otro compuesto antioxidante

llamado "rosmanol" (fig. 18) que es un diterpeno fenólico con estructura similar al carnosol. En un estudio subsecuente, en 1982, Inatani et. al. (19) reportaron el método utilizado para aislar este compuesto y que su actividad antioxidante es aproximadamente 4 veces mayor que la de antioxidantes sintéticos como BHA y BHT.

Recientemente, Houlihan et. al. (16,17) aislaron e identificaron otros dos compuestos antioxidantes de las hojas del romero; un diterpeno fenólico llamado "rosmaridifenol" y un diterpeno llamado "rosmariquinona" (figs. 19 y 20 respectivamente); demostrando que a una concentración de 0.02% superan la actividad antioxidante del BHA y que la actividad del primero se aproxima a la del BHT mientras que la del segundo es ligeramente menor a la del BHT (tabla V).

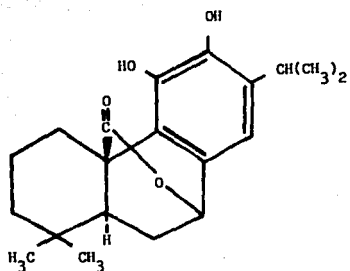


Figura 13.- Estructura Química del Carnosol.

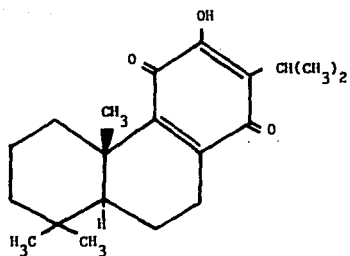


Figura 14.- Estructura Química de Royleanona.

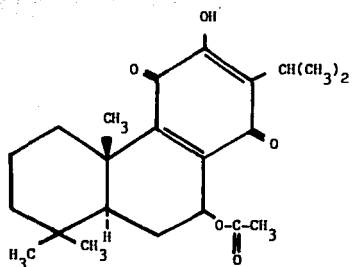


Figura 15.- Estructura Química de Acetoxiroyleanona.

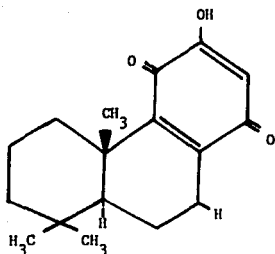


Figura 16.- Estructura Química de Dehidroroyleanona.

T A B L A III

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO DE ROMERO

Aditivo (0.02%)	Indice de peróxidos (meq/kg) en grasa de cerdo almacenada a 60°C durante días				
	6	14	21	28	36
Control	1.7	7.4	23.0	99.4	220.0
BHT	0.9	2.0	2.7	3.6	4.3
BHA	1.2	4.0	7.4	12.4	18.1
RA*	0.8	1.4	2.1	2.5	3.9

RA* = Extracto de romero

T A B L A IV

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LAS FRACCIONES CROMATOGRAFICAS DEL
EXTRACTO DE ROMERO.

Aditivo (0.02%)	Indice de peróxidos (meq/kg) en grasa de cerdo almacenada a 60°C durante semanas				
	0	1	2	3	4
Control	0.2	1.4	5.1	10.6	31.0
BHT	0.2	0.6	1.2	1.6	2.0
BHA	0.2	1.0	3.0	7.0	7.8
Fracc 1A	0.2	1.1	1.8	2.3	2.6
" 1B	0.2	1.0	1.3	1.6	2.4
" 2A	0.2	---	1.7	2.1	2.8
" 2B	0.2	1.0	1.5	2.0	2.6
" 3A	0.2	0.8	1.8	2.5	3.6
" 3B	0.2	1.1	2.6	3.3	4.8
" 3C	0.2	0.8	2.1	3.0	4.4
Carnosol	0.2	0.3	2.1	2.5	3.6
Fracc 4A	0.2	---	---	8.8	13.7
" 4B	0.2	1.7	3.0	3.8	5.1
" 5A	0.2	---	---	8.4	13.4
" 5B	0.2	1.1	2.0	2.6	3.2
" 5C	0.2	---	5.3	8.9	22.9
" 6	0.2	1.0	2.2	3.2	8.2
" 7A	0.2	1.0	2.4	4.2	7.2
" 7B	0.2	---	---	7.3	15.0

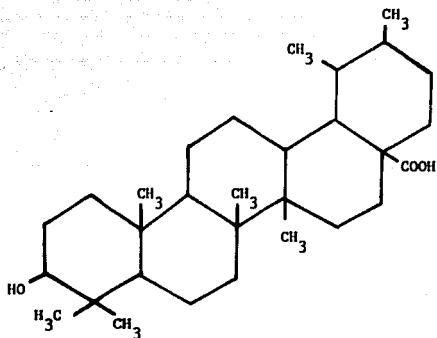


Figura 17.- Estructura Química del Acido Ursólico.

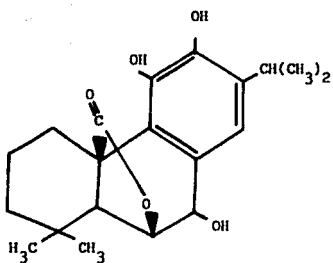


Figura 18.- Estructura Química del Rosmanol.

T A B L A V

ACTIVIDAD DE LOS ANTIOXIDANTES NATURALES ROSMARIDIFENOL
Y ROSMARIQUINONA

Aditivo (0.02%)	Indice de peróxidos (meq/kg) en grasa de cerdo almacenada a 60°C durante días.			
	7	14	21	28
Control	4.7	10.08	29.93	119.67
BHT	1.26	1.86	2.71	3.37
BHA	2.72	6.54	12.10	17.01
Rosmaridi- fenol	1.57	2.30	3.10	4.09
Rosmari -- quinona	3.28	3.81	4.52	5.10

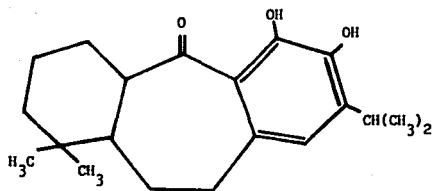


Figura 19.- Estructura Química de Rosmaridifenol.

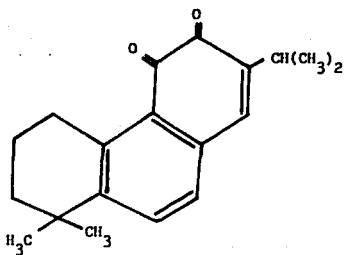


Figura 20.- Estructura Química de Rosmariquinona.

3.5) MECANISMO DE ACCION DE LOS ANTIOXIDANTES

En un capítulo previo, se explicó que la autoxidación de los lípidos se efectúa mediante una reacción en cadena, de tal manera que este fenómeno puede inhibirse adicionando agentes que retarden la formación de radicales libres o bien, de agentes aceptores de radicales libres (20).

Numerosos estudios relacionados con la manera de inhibir la oxidación de los lípidos, indican que los antioxidantes actúan mediante diferentes mecanismos; Shelton (13) describe cuatro posibilidades:

- 1.- Donación de átomos de hidrógeno por el antioxidante.
- 2.- Donación de electrones por el antioxidante.
- 3.- Adición del lípido al anillo aromático del antioxidante.
- 4.- Formación de un complejo entre el lípido y el anillo aromático del antioxidante.

Sin embargo, reemplazando el átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo de un antioxidante artificial típico por deuterio, el aditivo no fué efectivo en contra de la oxidación; lo cual indica que los antioxidantes son donadores de átomos de hidrógeno más que de electrones. Varios autores coinciden en que la donación del átomo de hidrógeno es la primera reacción del efecto antioxidante de estos compuestos; y que la formación de un

complejo entre el compuesto antioxidante y la cadena del lípido es una reacción secundaria (13).

La Fig.21 ilustra la reacción típica de un antioxidante.

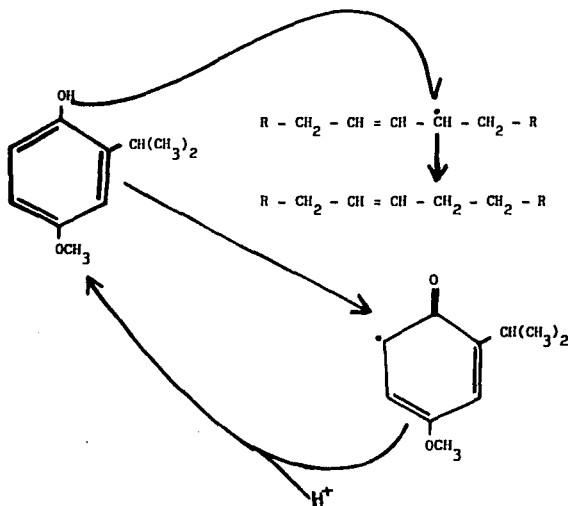


Figura 21.- Mecanismo de acción de los antioxidantes.

Por otro lado, se cree que la autoxidación de lípidos poliinsaturados se inicia con una reacción previa a la formación de hidroperóxidos estables ocasionando el fenómeno conocido como "reversión del sabor", el cual no es inhibido por los antioxidantes comunes (13).

4) LEGISLACIONES GUBERNAMENTALES PARA EL USO DE ANTIOXIDANTES EN ALIMENTOS

En una conferencia a la que asistieron los representantes de la "Organización de Agricultura y Alimentos" de los Estados Unidos ("Food and Agricultural Organization") (FAO) y los representantes de la "Organización Mundial de la Salud" ("World Health Organization") (WHO) se formó un comité de expertos en aditivos para alimentos y el denominado "Comité del Codex Alimentario" cuya finalidad fué crear el "Codex Mundial Alimentario", en donde existe una sección que lista los límites de uso para diversos antioxidantes (13).

En el título noveno, artículo 672 de la primera sección del Diario Oficial de la Federación publicado el lunes 18 de Enero de 1988, se define a un antioxidante como "la sustancia o mezcla de sustancias destinadas a retardar o impedir la oxidación y enranciamiento de los alimentos" y se indica que solo se permite el empleo de los siguientes antioxidantes en México:

- 1) Acido ascórbico
- 2) Acido eritórbico
- 3) Alfa tocoferol
- 4) Ascorbato de sodio; ascorbato de calcio.
- 5) 4, hidroximetil-1,2,6,-diterbutil fenol
- 6) Butilhidroxianisol
- 7) Butilhidroxitolueno

- 8) 2,5-diterbutilhidroquinona
- 9) Eritorbato de sodio
- 10) Galato de dodecilo
- 11) Galato de propilo
- 12) Lecitina
- 13) Palmitato de ascorbilo
- 14) Resina de guayacol
- 15) Tiodipropionato de dilaurilo
- 16) Tocoferoles mixtos
- 17) Los demás que autorice la secretaria

Asimismo en el artículo 701 de este documento se especifica que queda prohibido emplear como aditivo para alimentos y bebidas el ácido nordihidrido guayarético (NDGA).

Recientemente, en el tema 7c. del programa conjunto FAO/WHO sobre Normas Alimentarias publicada por la Comisión del Codex Alimentarius se indican las medidas que habrá de aplicar el Comité del Codex sobre Aditivos Alimentarios y Contaminantes (CCFAC) decididas en su 20ª reunión efectuada del 7 al 12 de Marzo de 1988 como consecuencia del cambio del estado de aprobación de las Ingestas Diarias Admisibles (IDA) de aditivos alimentarios propuestos por la Junta de Expertos en Aditivos para el Codex Alimentario (JECFA) en sus 30ª y 31ª reuniones.

En el quinto punto de este documento se indica una reducción considerable de la IDA asignada para los antioxidantes BHA, BHT y TBHQ; además de retirar las asignadas para los galatos de octilo y dodecilo.

A continuación se indica la IDA anterior y la actual asignada a estos aditivos alimentarios:

	IDA Anterior -----	IDA Actual -----
BHA	0-0.5 solos	0-0.3
BHT	0-0.5 o	0-0.125
TBHQ	0-0.5 mezclados	0-0.2
Galato de propilo	0-0.2	0-2.5
Galato de octilo	0-0.2	retirada
Galato de dodecilo	0-0.2	retirada

En consecuencia, el Comité del Codex sobre Grasas y Aceites en su última reunión (12^º) revisó y enmendó las dosis máximas de BHA, BHT, TBHQ y los galatos en las correspondientes Normas para Grasas y Aceites:

	Dosis máxima en el producto final -----	
	Disposición antigua	Disposición enmendada
	-----	-----
Galato de propilo	100 mg/Kg	100 mg/Kg
Galato de octilo	solos o	individualmente
Galato de dodecilo	mezclados	- - - - -
BHT	200 mg/Kg	75 mg/Kg
BHA	solos o mezclados	175 mg/Kg

TBHQ	- - - -	120 mg/Kg
Combinación de BHA	200 mg/Kg	200 mg/Kg sin
BHT y TBHQ y galatos	solos o mezclados	que se excedan
	sin que el BHA, BHT	los límites
	y los galatos excedan	individuales
	de 100 mg/Kg.	

Ahora bien, según las legislaciones del "Acta de Alimentos, Drogas y Cosméticos" ("Food, Drug and Cosmetic Act") no se permite adicionar más del 0.02% (200 ppm) de los antioxidantes aprobados basado en el contenido de grasa del alimento, mientras que las "Actas de Inspección de Carne y Aves" ("Meat Inspection Act" y "Poultry Inspection Act") definen que se puede utilizar más del 0.01% (100 ppm) de un solo antioxidante y no más del 0.02% (200 ppm) de una combinación de ellos basado en el contenido de grasa del alimento (13); sin embargo, estos rangos de tolerancia se modifican continuamente.

Las nuevas disposiciones gubernamentales en lo que se refiere a antioxidantes para alimentos "Generalmente Reconocidos Como Seguros" (GRAS), se pueden encontrar en el "Codex de Regulaciones Federales" ("Codex of Federal Regulations") parte 21.187.

Una de las pruebas más importantes que requiere la "Administración de Alimentos y Drogas" ("Food and Drug Administration") (FDA) para reconocer un aditivo como seguro (14), es la llamada "Dosis Letal Media", en la que se suministra

una dieta con el aditivo a animales como ratas, conejos y perros realizando un exámen histopatológico periódicamente. De igual manera, se estudia la ruta metabólica del aditivo y los efectos bioquímicos de los metabolitos producidos. La dosis letal media indica la dosis del aditivo en la cual la mitad de los animales de experimentación muere.

Para ser considerado como seguro, un aditivo debe tener una dosis letal media de no más de 1g/kg basado en el cuerpo del animal, además, no debe causar efecto significativo en el crecimiento del animal cuando se suministre una dieta durante un periodo de dos años que contenga 100 veces mas la cantidad del aditivo propuesto para el humano (14).

5) ALGUNOS METODOS PARA DETERMINAR EL GRADO
DE OXIDACION DE LOS LIPIDOS.

Antes de hacer una revisión de los metodos físicos y químicos para determinar el grado de oxidación de los lípidos, es necesario aclarar las diferencias que existen entre las pruebas de "susceptibilidad a la oxidación" y las pruebas que determinan el "grado de oxidación" de los lípidos.

Las pruebas de susceptibilidad miden la estabilidad de los lípidos sometiénolos a condiciones drásticas que favorecen su oxidación, evaluando constantemente el progreso de ésta utilizando metodos físicos, químicos o sensoriales (15).

Estas pruebas incluyen: (12, 13)

A) El Método del Oxígeno Activo (AOM).

En este procedimiento, se bombea aire purificado a una velocidad constante sobre el lípido a evaluar, manteniendo una temperatura elevada (usualmente de 100°C) y se monitorea el progreso de la oxidación frecuentemente.

B) Almacenamiento a temperaturas elevadas (Schall Oven Test).

En este método, las muestras se almacenan a temperaturas alrededor de 60-62°C, y se evalúa diariamente el progreso de la oxidación utilizando el análisis sensorial o alguno de los métodos físicos o químicos.

C) Bomba de Oxígeno.

En este método, la muestra a evaluar se coloca en un recipiente de acero inoxidable cerrado y se bombea oxígeno monitoreando los cambios de presión constantemente. Cuando empieza la oxidación del lípido, la presión disminuye a consecuencia de la absorción de oxígeno.

Los métodos físicos y químicos que se discuten a continuación, proporcionan información acerca de las diferentes etapas del proceso oxidativo; sin embargo, indicar mediante estos métodos el momento exacto en que ocurre la rancidez es arbitrario, pues es difícil determinar exactamente en que momento el lípido será rechazado por los consumidores (15).

5.1) EVALUACION SENSORIAL.

Este sistema, requiere de un panel de jueces entrenados que evalúen el olor y el sabor de las muestras proporcionadas; posteriormente, los resultados obtenidos se analizan utilizando modelos estadísticos específicos con el fin de concluir si existe el atributo sensorial conocido como rancidez, que es descrito como los olores y sabores desagradables ocasionados por la acumulación de los productos de descomposición de los lípidos (15).

Las principales desventajas de este sistema de evaluación,

son la gran cantidad de tiempo requerido y su reproducibilidad deficiente; sin embargo, tanto los métodos físicos como los químicos deben correlacionarse de alguna manera con la evaluación sensorial (15).

5.2) METODOS QUIMICOS.

5.2.1.) INDICE DE PEROXIDOS.

Debido a que los hidroperóxidos (generalmente reconocidos como peróxidos) son los productos de la oxidación de los lípidos que aparecen primero, es lógico que la determinación de su concentración sea útil como evaluación del grado de oxidación; sin embargo, esto está limitado por su rápida transformación en otros compuestos que provocan los olores y sabores indeseables, y por su alta sensibilidad a temperaturas elevadas (15,23).

Existen numerosos procedimientos analíticos para determinar el índice de peróxidos y, en consecuencia, es necesario indicar el método utilizado junto con el resultado obtenido (15).

Uno de los métodos más utilizados es el yodométrico, basado en la determinación volumétrica del yodo desprendido a partir del yoduro de potasio por la acción de los peróxidos presentes en el lípido. Las 2 fuentes principales de error en este método son: la absorción del yodo desprendido por las insaturaciones del material lipídico, y la liberación de yodo a partir del yoduro de potasio por la presencia de oxígeno en la solución a ser valorada

Otras posibles fuentes de error incluyen: variación en el peso de la muestra, tipo de solvente usado y variación en las condiciones de reacción como tiempo y temperatura (15).

El método yodométrico, ha sido adoptado como el método oficial para la determinación del índice de peróxidos en grasas y aceites por la "Asociación Oficial de Químicos Analistas" ("Association of Official Analytical Chemists") (A.O.A.C.) (21), aunque presenta la desventaja de que no puede ser utilizado para determinar índices de peróxido muy pequeños por la dificultad de observar el punto final durante la valoración; sin embargo, existe una variación sustituyendo la valoración por una técnica electroquímica, en donde el yodo liberado se reduce en un electrodo de platino mantenido a un potencial constante; así, se han logrado determinar índices en el rango de 0.06 a 20 meq/kg (15).

Otro método para determinar el índice de peróxidos es el colorimétrico, basado en la oxidación del ion ferroso a férrico por la acción de los peróxidos presentes en el lípido y en la posterior determinación del ion férrico como tiocianato férrico.

La sensibilidad y reproducibilidad de éste método son excelentes; sin embargo, cuando se comparó con el método yodométrico al experimentar con lípidos durante la prueba de la bomba de oxígeno, se observó que el índice de peróxidos determinado era demasiado alto con respecto a la absorción de oxígeno (15).

Aunque el índice de peróxidos es una determinación común para observar el grado de oxidación del lípido, está limitado a las primeras etapas de la reacción de oxidación, y por tanto, los pasos siguientes en el proceso deteriorativo no serán detectados. Sin embargo, se han reportado correlaciones entre el método oficial para el índice de peróxidos y evaluaciones sensoriales (15).

5.2.2) PRUEBA DEL ACIDO TIOBARBITURICO (TBA)

El principio del método del ácido tiobarbitúrico está basado en la reacción de condensación entre dos moléculas de TBA y una de malonaldehído que forma un compuesto cromógeno de color rojo cuya concentración se puede determinar espectroscópicamente a 532 nm (1) (fig.22). Sin embargo, solo los peróxidos que poseen insaturaciones beta o gamma son capaces de formar el malonaldehído, estos tipos de peróxidos solo se producen a partir de ácidos grasos que contienen 3 o mas dobles enlaces (15).

El método de TBA para determinar el grado de oxidación puede efectuarse de 2 maneras diferentes: 1).- Aplicado a los alimentos en forma directa después de eliminar todos sus pigmentos y 2).- En la fracción del alimento que se obtiene por una destilación con vapor (1).

Durante la determinación del grado de oxidación del lípido por este método, es indispensable elaborar un blanco, pues la

estructura del TBA se altera en condiciones ácidas, con tratamientos térmicos y compuestos oxidantes, factores que siempre están presentes durante el desarrollo del análisis. Asimismo, es necesario evaluar la intensidad del color producido a 532 nm; pues si se usan otras longitudes de onda, los valores de absorbancia pueden ser resultado de pigmentos producidos por la reacción del TBA con otros compuestos que no son productos de la oxidación de los lípidos (15).

Se ha demostrado que la prueba del ácido tiobarbitúrico es la técnica más confiable en el análisis del desarrollo de la reacción de oxidación de las grasas, y que relaciona satisfactoriamente los resultados provenientes de la evaluación sensorial, lo cual se respalda por una variedad de estudios como es el caso de los resultados obtenidos en una investigación reciente utilizando un producto de baja humedad a base de carne y grasa de pollo (8).

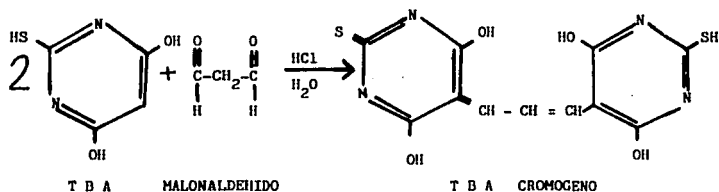


Figura 22.- Reacción del Acido Tiobarbitúrico,

5.2.3) PRUEBA DE KREIS.

Es una prueba cualitativa en la que se produce una coloración roja cuando el fluoroglucinol, en solución ácida, reacciona con los compuestos producidos en la oxidación de los lípidos (15).

La principal desventaja de esta prueba, es que el desarrollo del color no necesariamente es indicio de oxidación del lípido, pues se ha visto que resulta positiva cuando se aplica a muestras frescas y libres de rancidez, además de que su reproducibilidad es deficiente (15).

5.2.4) COMPUESTOS CARBONÍLICOS VOLÁTILES Y TOTALES.

Un método alternativo para medir el grado de oxidación de un lípido es la determinación de la concentración de los compuestos carbonílicos formados por la degradación de los hidroperóxidos, y posiblemente el procedimiento analítico más usado es el de Henick et. al. (15,13) basado en la reacción entre la 2,4-dinitrofenilhidrazina con los compuestos carbonílicos presentes en el lípido y con la ayuda del ácido tricloroacético como catalizador para formar el compuesto colorido 2,4-dinitrofenilhidrazona del compuesto carbonílico; sin embargo, este método es criticado a causa de que los hidroperóxidos se descomponen en las condiciones de reacción.

Este procedimiento mide principalmente los compuestos carbonílicos de alto peso molecular y, aunque estos pueden ser precursores de compuestos carbonílicos volátiles que proporcionan mal olor, su determinación no es indicio de que el lípido ya tenga mal sabor o que este rancio; por tales razones, últimamente se han separado mediante una destilación al vacío o a presión atmosférica, identificado y cuantificado los compuestos carbonílicos volátiles presentes en el lípido (15,23).

De esta manera, una ventaja muy importante es que se determina la concentración de los productos que ocasionan el mal sabor y olor de las grasas rancias; sin embargo, es preciso establecer condiciones experimentales que no afecten a los hidroperóxidos presentes en el lípido (15).

5.3) METODOS FISICOS.

5.3.1) METODO DE DIENOS CONJUGADOS.

La oxidación de ácidos grasos poliinsaturados puede ser determinada mediante los cambios que ocurren en la absorción dentro del espectro ultravioleta; pues los ácidos grasos que contienen insaturaciones conjugadas absorben en la región de 230 a 375 nm, mientras que los dienos insaturados absorben a 234 nm y los trienos insaturados a 268 nm. Se ha observado que los aceites cuyo contenido de ácido linoleico, o de ácidos grasos más insaturados es elevada, producen dienos conjugados después de su oxidación; de tal manera, que el deterioro oxidativo que ha

sufrido el aceite se puede determinar si existe absorción a 234 nm (15).

Farmer y Sutton (15), reportan que la absorción en el espectro ultravioleta se incrementa en forma proporcional a la absorción de oxígeno y a la formación de peróxidos en las primeras etapas de la oxidación.

Este método tiene las ventajas de ser más rápido que el índice de peróxidos, es más simple, no depende de una reacción química que desarrolle coloración y puede ser aplicado a muestras pequeñas (15).

5.3.2) ESPECTROSCOPIA INFRARROJA.

La espectroscopía infrarroja es una evaluación útil para la identificación de grupos funcionales no usuales y para el estudio de ácidos grasos con dobles enlaces trans; pero gracias a que los compuestos formados durante la oxidación de los lípidos se transforman continuamente, la espectroscopía infrarroja se puede usar para seguir el curso del deterioro oxidativo (15).

O'Connors, en un estudio relacionado con la espectroscopía infrarroja, describe que (15):

a) La aparición de bandas a 2.93μ , indican la formación de hidroperóxidos.

b) La desaparición de la banda a 3.2μ , indica el reemplazo de un hidrógeno de un doble enlace por otro radical, probablemente indicando una polimerización.

c) La aparición de bandas adicionales a 5.72μ , indican la formación de aldehídos, cetonas o ácidos.

d) Cambios en las bandas en la región de 10 a 11μ , indican isomerizaciones cis-trans y probablemente la formación de enlaces conjugados.

Aunque este método es simple, rápido y requiere de muestras pequeñas, solo da información cualitativa acerca del deterioro oxidativo que sufren los lípidos, especialmente durante las primeras etapas de la reacción (15).

5.3.3) POLAROGRAFIA.

Ultimamente, los métodos polarográficos se han utilizado para la cuantificación de peróxidos en grasas; pues se ha visto, que en las primeras etapas del deterioro oxidativo existe una relación lineal entre la altura de la onda registrada y el índice de peróxidos además de que pueden diferenciar perfectamente entre las estructuras $-O-O$ y $-OOH$ dando resultados más precisos; sin embargo, esta técnica aún no es muy usada como control de calidad en la industria (15).

5.3.4) CROMATOGRAFIA DE GASES.

La cromatografía de gases se ha usado para separar e identificar los productos de la oxidación de los lípidos en sistemas modelo con el fin de entender el mecanismo del proceso deteriorativo; sin embargo, algunos autores utilizan esta técnica como rutina para determinar si existe rancidez, aplicándola a muestras simples como es el caso de los aceites vegetales, pues en sistemas complejos la identificación de los productos de descomposición es mucho mas complicada (15).

6) DESARROLLO EXPERIMENTAL.

6.1) OBTENCION DEL EXTRACTO DE ANTIOXIDANTES NATURALES A PARTIR DEL ROMERO

Con el propósito de obtener el extracto de antioxidantes naturales a partir de la especia conocida como Romero (Rosmarinus officinalis) de una manera rápida y sencilla, se efectuaron algunas variaciones dentro de las condiciones de un proceso de extracción ya establecido.

Así, se utilizaron 2 tipos de disolventes: uno polar (metanol) y otro no polar (hexano).

Utilizando hexano, se realizó el proceso de extracción de 2 maneras diferentes:

- A reflujo durante 2 horas.
- Dejando reposar 24 horas a temperatura ambiente.

Finalmente, el proceso de obtención del extracto de antioxidantes naturales a partir del romero fué el siguiente:

Se pesaron 1405 g. de romero fresco con un 60% de humedad y se secaron a 100°C durante 90 minutos; de esta manera, se lograron recuperar 400 g. de hojas con un 5% de humedad que se molieron hasta un tamaño de partícula adecuado.

Posteriormente, 390 g. de hojas de romero secas y finamente molidas se extrajeron con 650 ml de metanol bajo condiciones de reflujo durante 2 horas. La mezcla se filtró y el residuo se extrajo nuevamente con 650 ml de metanol fresco bajo las mismas condiciones.

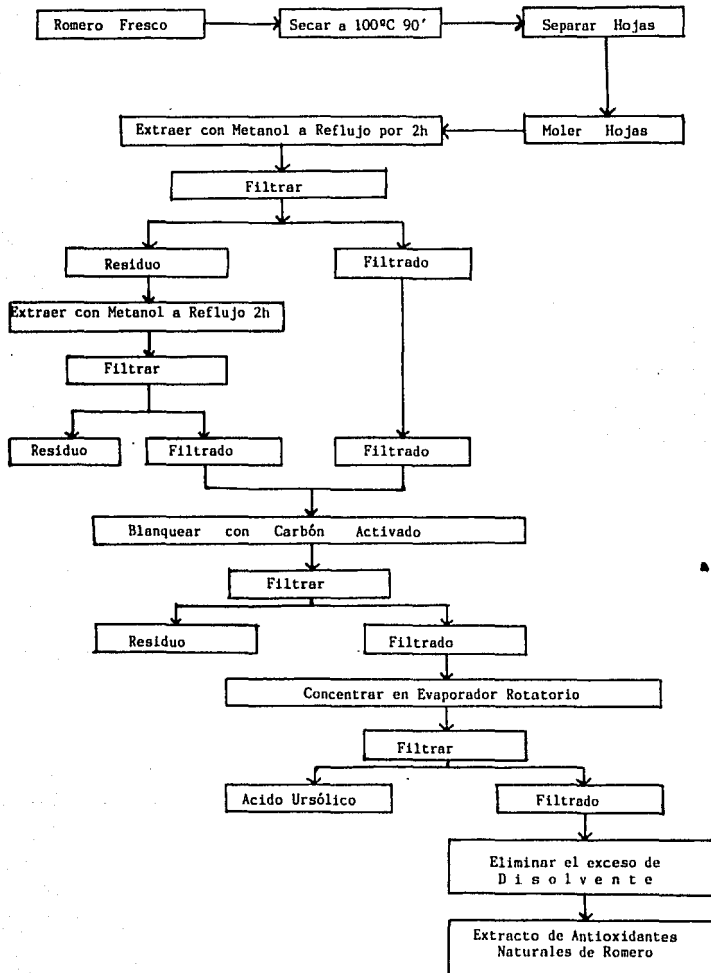
La combinación de filtrados de un color café, se blanqueó usando 35 g. de carbón activado y se filtró para producir una solución amarillenta.

La solución anterior se concentró mediante un evaporador rotatorio hasta 150 ml aproximadamente; durante esta operación, precipitaron 2.1141 g. de una sustancia blanca que se presume es ácido ursólico (25) y que se separó por filtración al vacío.

El filtrado así obtenido, se calentó a ebullición (65 °C) con el fin de eliminar el exceso de disolvente y obtener 14 g. del extracto de antioxidantes naturales de romero de un color amarillo y ligero olor característico de la especia.

A continuación se presenta un esquema que resume el procedimiento empleado para la obtención de antioxidantes naturales de romero:

OBTENCION DEL EXTRACTO DE ANTIOXIDANTES NATURALES A PARTIR DEL ROMERO.



Asimismo, se realizó una separación de los componentes del extracto de romero mediante el siguiente procedimiento:

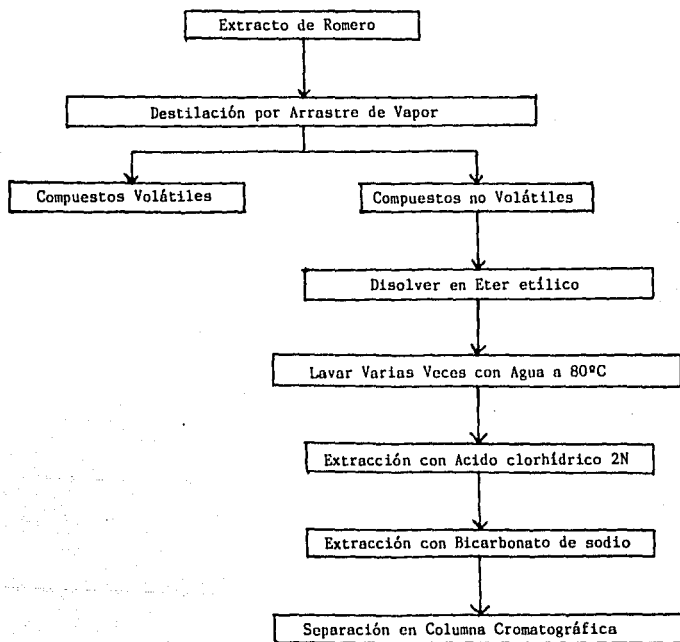
El extracto se sometió a una destilación por arrastre de vapor a presión atmosférica con el fin de eliminar los compuestos volátiles.

La fracción no volátil se disolvió en eter etílico y se lavó varias veces con agua destilada a 80 °C. Posteriormente, se extrajo con 100 ml de una solución 2N de HCl empleando un embudo de separación.

El siguiente paso fue realizar una nueva extracción con una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio.

Finalmente, se realizó una cromatografía en columna de la solución anterior empleando sílica gel como soporte y una solución de benceno - acetona 9:1 v/v como eluyente.

SEPARACION DE LOS COMPONENTES DEL EXTRACTO DE ROMERO:



6.2) SEPARACION DE UN COMPUESTO CON POSIBLE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO DE ROMERO

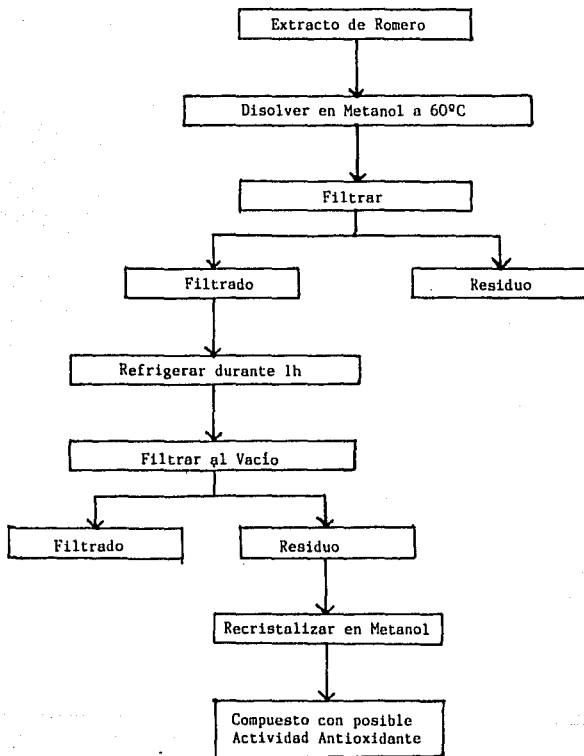
En esta etapa de la investigación, se pesaron 1550 g. de romero fresco y se sometieron al proceso de extracción explicado anteriormente usando hexano como disolvente; de esta manera, se obtuvieron 6 g. de extracto de antioxidantes naturales de romero.

Este extracto, se disolvió en 200 ml. de metanol a 60°C, y se separaron los compuestos insolubles de los solubles por medio de una filtración.

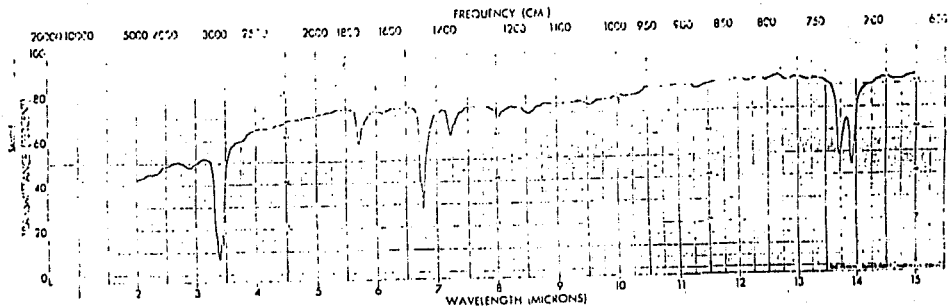
Posteriormente, la solución se colocó bajo refrigeración durante una hora en donde cristalizó un compuesto de color amarillo que se aisló por medio de una filtración al vacío.

El compuesto así obtenido, se recrystalizó empleando metanol logrando recuperar 0.3 g. del compuesto ya purificado, al cual, se le determinó el punto de fusión empleando un aparato "Fisher-Johns" resultando ser de 60-62°C. Asimismo, se obtuvo un espectro infrarrojo empleando un espectrofotómetro "Perkin Elmer" modelo 21 con una pastilla de bromuro de potasio y un espectro ultravioleta utilizando un espectrofotómetro "Beckman" modelo DU-65 con el fin de caracterizar de una manera muy general el compuesto aislado.

SEPARACION DE UN COMPUESTO CON POSIBLE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE
A PARTIR DEL EXTRACTO DE ROMERO



ESPECTRO INFRARROJO DEL COMPUESTO AISLADO.

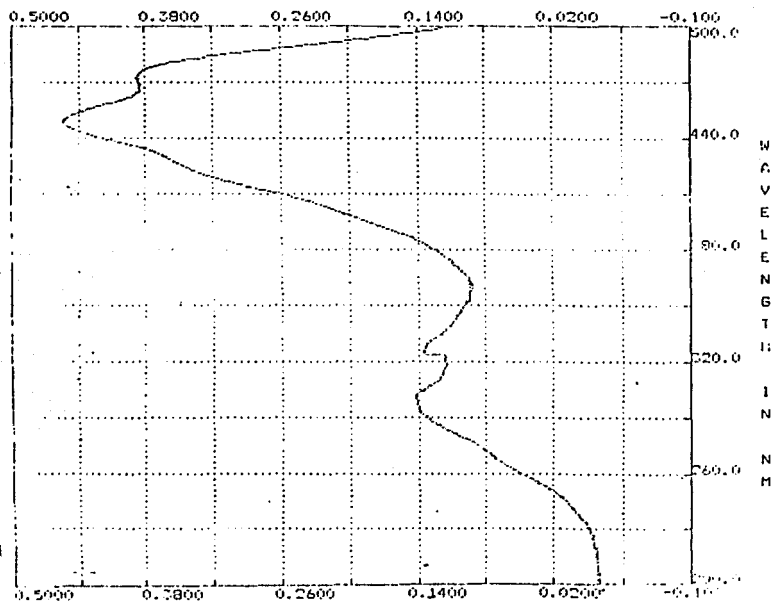


ESPECTRO ULTRAVIOLETA DEL COMPUESTO AISLADO.

BECKMAN

DU-65 SPECTROPHOTOMETER

ABSORBANCE



Scan Speed: 500 nm/min

6.3) APLICACION DEL EXTRACTO DE ANTIOXIDANTES NATURALES Y DEL COMPUESTO AISLADO A SISTEMAS ALIMENTICIOS

El extracto de antioxidantes naturales de romero y el compuesto aislado, se aplicaron en aceite de soya en una concentración de 0.02% (200 ppm).

El aceite de soya, es un lípido que pertenece al grupo del ácido linolénico (12) cuya distribución de ácidos grasos es la siguiente (24):

Acidos grasos saturados:

- Butírico, caproico, caprílico, cáprico y láurico menor al 0.1%.
- Mirístico, menor al 0.5%.
- Palmítico, entre el 7 y el 11%.
- Esteárico, entre el 2 y el 6%.
- Araquídico, menor al 1.0%.

Acidos grasos insaturados:

- Palmitoleico, menor al 0.5%.
- Oleico, entre el 15 y el 33%.
- Linoleico, entre el 43 y el 56%.
- Linolénico, entre el 5 y el 11%.

6.3.1) EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO DE ROMERO Y DEL COMPUESTO AISLADO.

La actividad antioxidante del extracto de romero y del compuesto aislado, se evaluó midiendo la capacidad de retardar la formación de peróxidos y, consecuentemente, de sustancias reactantes con el ácido tiobarbitúrico aplicándolos en aceite de soya en una concentración de 0.02% (200ppm).

Dicha actividad, se comparó con la de los antioxidantes artificiales butilhidroxianisol (BHA) y butilhidroxitolueno (BHT) suministrados al lípido en la misma concentración, y comparando el progreso de la oxidación con una muestra a la que no se le añadió aditivo.

Las muestras se almacenaron a 60 y 70 °C en la oscuridad con el fin de determinar el factor de calidad "Q₁₀", monitoreando frecuentemente el progreso de la oxidación empleando el método oficial para la determinación del índice de peróxidos en grasas y aceites (21) y la prueba del ácido tiobarbitúrico propuesta por Eskin et.al (10) (Anexo I); para posteriormente determinar la vida de anaquel del aceite de soya a diferentes temperaturas con cada aditivo.

PROGRAMA DE EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE
DEL EXTRACTO DE ROMERO Y DEL COMPUESTO AISLADO EN ACEITE DE SOYA

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO										
	60 °C					70 °C				
T I E M P O (D I A S)	Control	BHA 0.02%	BHT 0.02%	E.R 0.02%	C.A 0.02%	Control	BHA 0.02%	BHT 0.02%	E.R 0.02%	C.A 0.02%
0	IP/TBA	IP/TBA	IP/TBA	IP/TBA	IP/TBA	IP/TBA	IP/TBA	IP/TBA	IP/TBA	IP/TBA
1						IP	IP	IP	IP	IP
2	IP	IP	IP	IP	IP					
3										
4						IP/TBA	IP/TBA	IP/TBA	IP/TBA	IP/TBA
7	IP/TBA	IP/TBA	IP/TBA	IP/TBA	IP/TBA					
8						IP	IP	IP	IP	IP
9	IP	IP	IP	IP	IP					
10						IP	IP	IP	IP	IP
14	IP	IP	IP	IP	IP					
15						IP	IP	IP	IP	IP
16	IP	IP	IP	IP	IP					
17										
18	TBA	TBA	TBA	TBA	TBA					
21						TBA	TBA	TBA	TBA	TBA
24	TBA	TBA	TBA	TBA	TBA					

En Donde:

IP = Determinación de índice de peróxidos.

TBA = Prueba del ácido tiobarbitúrico.

E.R = Extracto de Romero

C.A = Compuesto Aislado.

PROGRAMA DE EVALUACION PARA COMPROBAR
EL COMPORTAMIENTO DEL ACEITE DE SOYA A 70°C

T I E M P O (H O R A S)	DETERMINACION
0	IP/TBA
2	IP
4	IP
7	IP
10	IP/TBA
24	IP/TBA
26	IP
28	IP
31	IP
33	IP/TBA

En Donde:

IP = Determinación de índice de peróxidos.

TBA = Prueba del ácido tiobarbitúrico.

7.0) R E S U L T A D O S

7.1) RENDIMIENTOS LOGRADOS AL OBTENER EL EXTRACTO DE ANTIOXIDANTES NATURALES Y EL COMPUESTO PURIFICADO.

A) Extracción con Metanol.-

A partir de 1405g. de romero fresco se lograron obtener 14 g. de extracto, de tal manera que:

$$\text{Rendimiento} = \frac{14\text{g. de extracto}}{1405\text{g. de romero fresco}} \times 100$$

$$\text{Rendimiento} = 0.9964\%$$

A partir de 1405g. de romero fresco, se recuperaron 390 g. de hojas secas y molidas, de tal manera que:

$$\text{Rendimiento en base seca} = \frac{14\text{g. de extracto}}{390\text{g. de hojas secas y molidas}} \times 100$$

$$\text{Rendimiento en base seca} = 3.5897\%$$

B) Extracción con Hexano:

A partir de 1550g. de romero fresco, se lograron obtener 6g. de extracto, de tal manera que:

$$\text{Rendimiento} = \frac{6 \text{ g. de extracto}}{1550 \text{ g. de romero fresco}} \times 100$$

$$\text{Rendimiento} = 0.3870\%$$

A partir de 1550 g. de romero fresco, se recuperaron 420 g. de hojas secas y molidas, de tal manera que:

$$\text{Rendimiento en base seca} = \frac{6 \text{ g. de extracto}}{420 \text{ g. de hojas secas y molidas}} \times 100$$

$$\text{Rendimiento en base seca} = 1.4285 \%$$

A partir de 1550 g. de romero fresco se obtuvieron 0.3 g. del compuesto purificado, de tal manera que:

$$\text{Rendimiento del compuesto purificado} = \frac{0.3 \text{ g. del compuesto}}{1550 \text{ g. de romero fresco}} \times 100$$

$$\text{Rendimiento del compuesto purificado} = 0.0193 \%$$

A partir de 1550 g. de romero fresco se recuperaron 420 g. de hojas secas y molidas, de tal manera que:

$$\text{Rendimiento en base seca} = \frac{0.3 \text{ g. del compuesto}}{420 \text{ g. de hojas secas y molidas}} \times 100$$

Rendimiento en
base seca = 0.0714 %

7.2) GRAFICAS DE INDICE DE PEROXIDOS VS TIEMPO Y SUSTANCIAS
REACTANTES CON TBA VS TIEMPO

A) Indice de Peróxidos (meq/kg) en aceite de soya almacenado a 60 °C en la oscuridad para cada uno de los aditivos empleados (gráfica 1):

TIEMPO (DIAS)	CONTROL	BUTILHIDROXI ANISOL	BUTILHIDROXI TOLUENO	EXTRACTO DE ROMERO	COMPUESTO AISLADO
0	1.91	1.91	1.91	1.91	1.91
2	14.32	12.41	8.59	7.64	21.96
7	36.29	32.47	17.19	21.01	49.66
9	47.75	21.01	43.94	56.34	101.23
14	76.40	56.34	47.75	57.30	109.82
16	97.41	76.40	42.95	85.95	136.56

B) Sustancias reactantes con TBA (mg de malonaldehído/kg de aceite) en aceite de soya almacenado a 60°C en la oscuridad para cada uno de los aditivos empleados (gráfica 2):

TIEMPO (DIAS)	CONTROL	BUTILHIDROXI ANISOL	BUTILHIDROXI TOLUENO	EXTRACTO DE ROMERO	COMPUESTO AISLADO
0	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18
7	1.39	0.95	0.87	1.35	1.64
18	2.12	0.98	0.82	0.84	0.93
24	0.40	0.56	0.32	0.53	0.75

C) Indice de Peróxidos (meq/kg) en aceite de soya almacenado a 70°C en la oscuridad para cada uno de los aditivos empleados

(gráfica 3):

TIEMPO (DIAS)	CONTROL	BUTILHIDROXI ANISOL	BUTILHIDROXI TOLUENO	EXTRACTO DE ROMERO	COMPUESTO AISLADO
0	1.91	1.91	1.91	1.91	1.91
1	14.32	10.50	8.59	17.19	18.14
4	18.14	18.14	53.48	30.56	27.69
8	16.23	24.83	63.03	53.48	25.78
10	55.39	71.62	97.41	78.31	55.39
15	59.21	93.59	96.45	97.41	59.21

D) Sustancias reactantes con TBA (mg de malonaldehído/kg de aceite) en aceite de soya almacenado a 70°C en la oscuridad para cada uno de los aditivos empleados. (gráfica 4)

TIEMPO (DIAS)	CONTROL	BUTILHIDROXI ANISOL	BUTILHIDROXI TOLUENO	EXTRACTO DE ROMERO	COMPUESTO AISLADO
0	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18
4	0.49	0.49	0.76	0.73	0.69
21	2.12	2.36	2.41	2.37	2.37

E) Índice de peróxidos en aceite de soya sin aditivo a 70 °C (gráfica 5)

TIEMPO (HORAS)	meq DE PEROXIDOS kg DE ACEITE
0	5.73
2	5.73
4	7.64
7	7.64
10	8.59
24	14.32
26	13.37
28	16.23
31	25.78
33	34.38

F) Sustancias reactantes con TBA en aceite de soya sin aditivo almacenado a 70°C (gráfica 6).

TIEMPO (HORAS)	mg DE TBA kg DE ACEITE
0	0.146
10	0.146
24	0.183
33	0.219

7.3) CALCULO DE LAS CONSTANTES DE DEGRADACION "K" PARA LOS DIFERENTES ANTIOXIDANTES EMPLEADOS.

De acuerdo a la investigación bibliográfica realizada (8), se asumió el valor de orden de reacción como $n=1$ para las reacciones correspondientes a la rancidez oxidativa.

Para las reacciones de orden cero y uno se ha establecido una expresión matemática (8) que define la pérdida de calidad en los alimentos de la siguiente manera:

$$- dA/dt = KA^n \quad (1)$$

Donde:

A = Factor de calidad medido en las unidades correspondientes.

t = Tiempo

K = Constante de degradación

n = orden de reacción

da/dt = Constante de cambio del factor de calidad contra el tiempo. El signo negativo se utiliza si el deterioro

implica pérdida de algún componente, y positivo si se refiere a la aparición de un producto final indeseable.

En el caso de las reacciones de rancidez, donde la vida de anaquel no presenta una constante de degradación y el producto sigue el patrón de las reacciones de orden uno, el cálculo del valor de "K" se realiza de la siguiente manera (8):

Integrando la ecuación (1)

$$\int_{A_0}^A dA/A = \int_{t_0}^t K dt$$

Se obtiene:

$$\ln A/A_0 = -Kt$$

$$\ln A - \ln A_0 = -Kt$$

$$\ln A = \ln A_0 - Kt$$

despejando K:

$$K = 1/t \ln A/A_0$$

Donde:

K = Constante de degradación del aceite de soya empleando el antioxidante en cuestión

A = Valor máximo obtenido de índice de peróxidos para el antioxidante en cuestión

A₀ = Valor inicial de índice de peróxidos para el antioxidante en cuestión

t = Tiempo en que se obtiene el máximo valor de índice de peróxidos para el antioxidante en cuestión

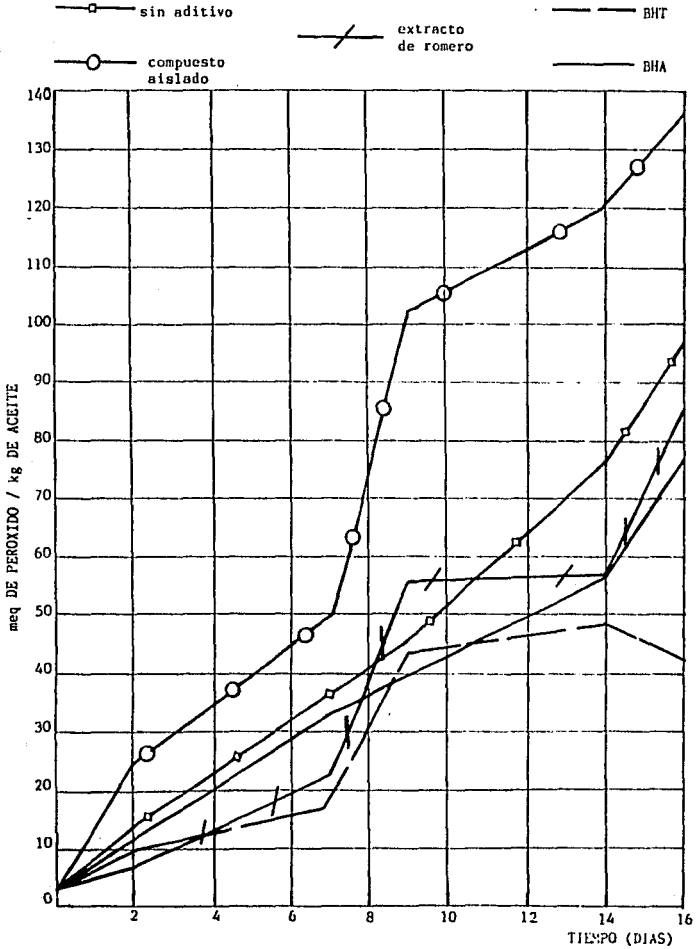
7.4) CALCULO DE LOS FACTORES DE CALIDAD "Q₁₀" PARA EL ACEITE DE SOYA CON LOS DIFERENTES ANTIOXIDANTES EMPLEADOS

Debido a que los análisis fisicoquímicos por si mismos no definen el periodo de estabilidad del producto, se utiliza la siguiente formula para calcular el factor de calidad del aceite de soya con cada uno de los antioxidantes empleados (8):

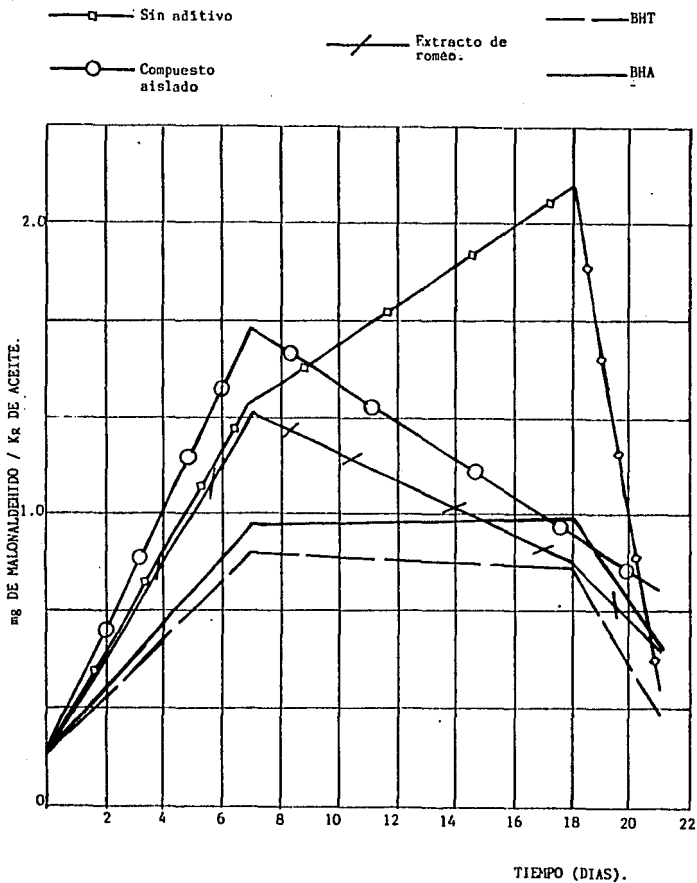
$$Q_{10} = \frac{\text{"K" a la temperatura T(T+10)}}{\text{"K" a la temperatura T}}$$

GRAFICA 1

INDICE DE PEROXIDOS VS TIEMPO EN ACEITE DE SOYA A 60°C. EN LA OSCURIDAD.

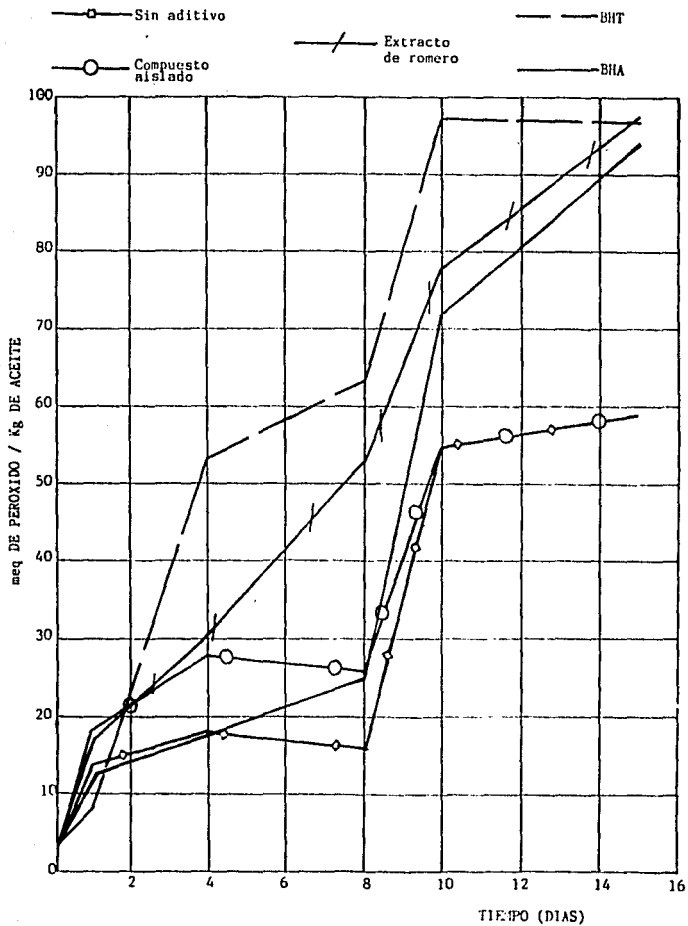


GRAFICA 2
 SUSTANCIAS REACTANTES CON TBA VS TIEMPO EN ACEITE DE SOYA ALMACENADO A 60°C
 EN LA OSCURIDAD.



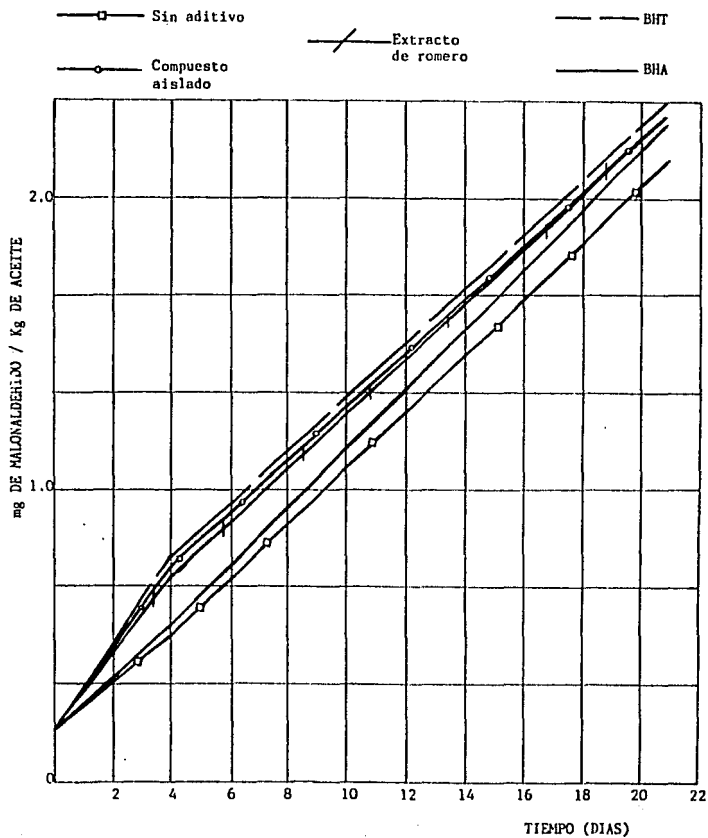
GAFICA 3

INDICE DE PEROXIDOS VS TIEMPO EN ACEITE DE SOYA A 70°C EN LA OSCURIDAD.



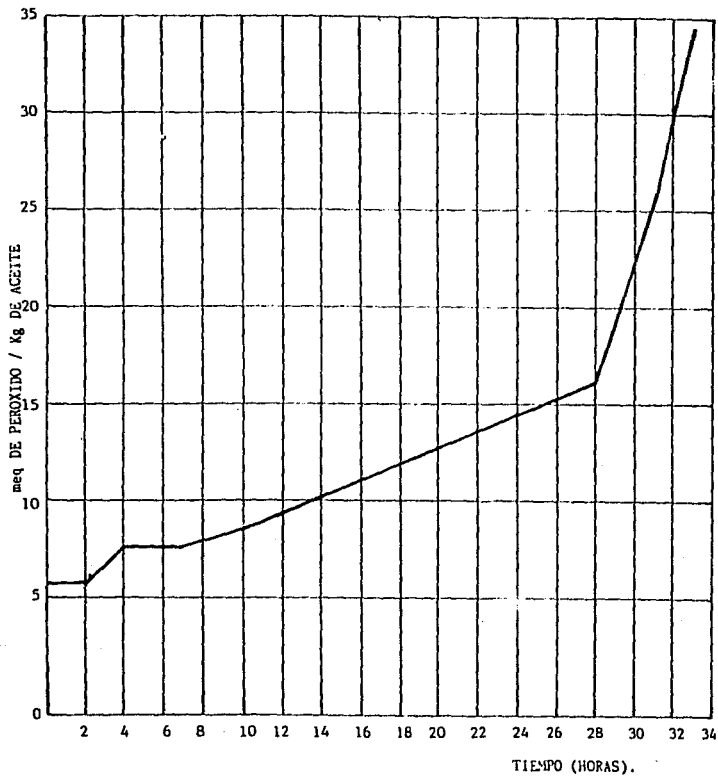
GRAFICA 4

SUSTANCIAS REACTANTES CON TBA VS TIEMPO EN ACEITE DE SOYA ALMACENADO A 70°C EN LA OSCURIDAD



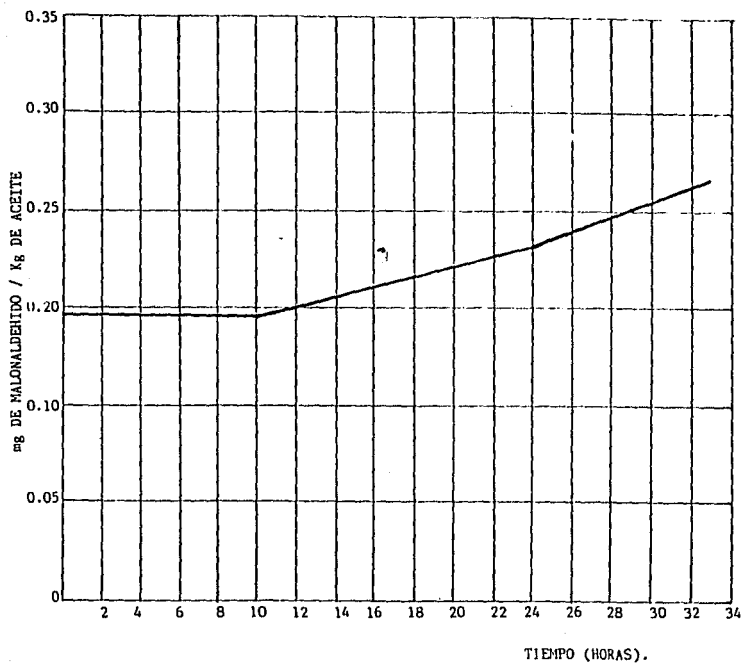
GRAFICA 5

INDICE DE PEROXIDOS VS TIEMPO EN ACEITE DE SOYA SIN ADITIVO ALMACENADO A 70°C
EN LA OSCURIDAD.



GRAFICA 6

SUSTANCIAS REACTANTES CON TBA VS TIEMPO EN ACEITE DE SOYA ALMACENADO A 70°C
EN LA OSCURIDAD Y SIN ADITIVO



8) ANALISIS DE RESULTADOS.

En la presente investigación, se utilizó un disolvente polar y uno no polar para obtener el extracto de antioxidantes naturales a partir de romero y, aunque ambos resultaron ser eficientes, usando metanol se logró un mayor rendimiento (3.5897 % en base seca) que usando hexano (1.4828 % en base seca).

Usando hexano como disolvente, se experimentó realizar la extracción a temperatura ambiente dejando reposar durante 24 horas. De esta manera se logró incrementar el rendimiento ligeramente, pero el tiempo requerido para realizar el proceso fue mucho mayor.

Usando metanol como disolvente, precipitó un compuesto de color blanco durante el proceso de extracción llamado ácido ursólico y que se separó del resto de los componentes del extracto pues, por ser insoluble en aceites vegetales, interfiere desfavorablemente con la actividad antioxidante (25); sin embargo, usando hexano, este compuesto no se logró separar.

Todo esto sugiere que es recomendable obtener el extracto de antioxidantes naturales a partir de romero empleando un disolvente polar y en condiciones de reflujo durante 2 horas; sin embargo, empleando ambos disolventes el extracto presentó un ligero color amarillo y un ligero olor característico de la especia.

Durante el desarrollo experimental, se efectuó una separación de los componentes del extracto de romero mediante una cromatografía en columna y, aunque el procedimiento fue efectuado

varias veces, no se logró cristalizar ningún compuesto en las fracciones eluidas; sin embargo, se aisló un compuesto a partir del extracto de romero mediante el procedimiento descrito anteriormente cuya estructura química no se logró dilucidar, pero que se caracterizó de una manera muy general mediante la determinación de su punto de fusión y con la obtención de un espectro ultravioleta y un espectro infrarrojo.

En la gráfica 1 se presenta el índice de peróxidos con respecto al tiempo en aceite de soya mantenido a 60°C y en la oscuridad con cada uno de los aditivos empleados, en donde se observa el mayor valor de peróxidos después de 16 días de almacenamiento en la muestra que contiene el compuesto aislado, lo cual no solo sugiere que éste no es efectivo contra la oxidación sino que, además, actúa como prooxidante, por lo que es conveniente separarlo del resto de los componentes del extracto.

De la misma manera, se observa que durante los primeros días de almacenamiento el valor de peróxidos en el aceite que contiene el extracto de romero es inferior al de la muestra que contiene el antioxidante artificial BHA y ligeramente superior al que corresponde a la muestra que contiene el antioxidante artificial BHT; sin embargo, al final del periodo de almacenamiento el valor de peróxidos en el aceite con el extracto de romero es superior al de las muestras que contienen los antioxidantes artificiales. Esto sugiere que el extracto de antioxidantes naturales de romero

obtenido en la presente experimentación, posee una actividad comparable con la del antioxidante artificial BHA e inferior a la del antioxidante artificial BHT en aceites vegetales.

En la gráfica 2 se presenta el desarrollo de sustancias reactantes con el ácido tiobarbitúrico con respecto al tiempo en aceite de soya mantenido a 60°C y en la oscuridad con cada uno de los aditivos empleados, en donde se observa la curva con pendiente más pronunciada en la muestra del aceite que contiene el compuesto aislado, lo que indica una oxidación muy acelerada desarrollandose así sustancias reactantes con TBA en un tiempo corto y sugiriendo nuevamente una actividad prooxidante por parte del compuesto aislado.

Asimismo, se observa que la curva correspondiente a la muestra de aceite con el extracto de romero presenta una pendiente menos pronunciada que la curva del aceite sin aditivo, pero mayor que aquella de las muestras que contienen los antioxidantes artificiales BHT y BHA; es decir, el desarrollo de las sustancias reactantes con el ácido tiobarbitúrico en el aceite de soya usando el extracto de romero como aditivo, fué más lento que en la muestra control, pero más rápido que en las muestras que contienen los antioxidantes BHA y BHT.

Lo anterior sugiere que el extracto obtenido a partir del romero en la presente experimentación presenta actividad antioxidante en un aceite vegetal, pero que dicha actividad es ligeramente inferior a la de los antioxidantes BHA y BHT.

En las gráficas 3 y 4 se presentan el índice de peróxidos y el desarrollo de sustancias reactantes con el ácido tiobarbitúrico respectivamente, en aceite de soya mantenido a 70C y en la oscuridad con cada uno de los aditivos utilizados, en donde se observa que el valor máximo de peróxidos y de sustancias reactantes con TBA después de 15 días de almacenamiento corresponden a la muestra que contiene el antioxidante artificial BHT. Esto puede explicarse si se considera que los peróxidos son el primer producto de la oxidación de los lípidos y que son altamente susceptibles a la descomposición por efecto de la temperatura, transformándose rápidamente en otros productos que, a su vez, reaccionaron con el ácido tiobarbitúrico, siendo probable que en las muestras de aceite que contenían compuestos antioxidantes menos activos, los peróxidos y las sustancias reactantes con el TBA se transformaran a una velocidad mayor de la que podían ser detectados. Sin embargo se observa que, después de la curva que corresponde a la muestra con el antioxidante artificial BHT, la curva con pendiente más pronunciada corresponde a la muestra de aceite que contiene el extracto de romero, seguida por la pendiente de la curva que contiene el antioxidante artificial BHA; lo cual sugiere que el extracto de romero obtenido en la presente investigación, posee una actividad antioxidante comparable con la del BHA e inferior a la del BHT, ya que a una temperatura tan elevada como son los 70°C, en el aceite con el extracto de romero se lograron detectar índices de peróxidos y valores de sustancias reactantes con TBA superiores a los detectados en la muestra que contiene el antioxidante BHA, debido a que la oxidación del lípido con el extracto fué más

lenta y por lo tanto estas sustancias no se transformaron en otros productos.

En la gráfica 3, las curvas que corresponden a las muestras de aceite sin aditivo y con el compuesto aislado, presentan un rápido incremento en el valor de índice de peróxidos después de 8 días de almacenamiento, lo cual sugiere la presencia de un tipo de reacción diferente a la de formación de hidroperóxidos, pues se trata de unas condiciones de almacenamiento muy drásticas y además presentan un comportamiento muy diferente al de las muestras con los otros aditivos en las mismas condiciones.

El comportamiento del aceite de soya almacenada a 70 °C se comprobó determinando el índice de peróxidos y las sustancias reactantes con el ácido tiobarbitúrico durante periodos de tiempo muy cortos, logrando así construir las gráficas 5 y 6.

En la gráfica 5 se observa muy claramente la reacción de iniciación y el principio de la reacción de propagación durante el deterioro oxidativo sufrido por el aceite, suponiendo que después de unas cuantas horas de almacenamiento el deterioro oxidativo llegaría a la fase de terminación.

En la gráfica 6 se observa un ligero incremento de sustancias reactantes con el ácido tiobarbitúrico después de 10 horas de almacenamiento, lo cual puede explicarse si se considera que los peróxidos formados en la etapa de iniciación se empezaron a transformar en otras sustancias que reaccionaron con el TBA;

sin embargo, no se observa un punto en el cual el valor de las sustancias reactantes con TBA se incremente bruscamente debido a que aún no existía la fase de terminación, etapa en la cual la mayoría de los peróxidos se transforman en otros compuestos que pueden reaccionar con el TBA.

Debido a que 70°C fué una temperatura de almacenamiento muy elevada, no se logró detectar el tiempo exacto en el que se obtuvo el máximo valor de peróxidos en las muestras de aceite de soya con cada uno de los aditivos empleados, siendo imposible determinar sus constantes de degradación y, consecuentemente, los factores de calidad "Q₁₀".

9) CONCLUSIONES.

- 1) El procedimiento empleado en la presente investigación constituye una alternativa rápida y sencilla para obtener un extracto de antioxidantes naturales a partir del romero; ciertamente, no existe una confianza absoluta de que sus componentes sean totalmente inocuos para el hombre, pero si se tiene la seguridad de que es una sustancia natural de un alimento que ha sido consumido durante miles de años y no un compuesto sintético.
- 2) Para obtener el extracto de antioxidantes naturales a partir del romero, se pueden utilizar tanto solventes polares como no polares; sin embargo, es recomendable usar solventes polares, pues se logra un mayor rendimiento y, además, se logra separar el ácido ursólico, compuesto insoluble en aceites vegetales que interfiere desfavorablemente con la actividad antioxidante.
- 3) En la presente investigación, se aisló un compuesto a partir del extracto de romero que es conveniente separar de los demás componentes del extracto, pues posee actividad prooxidante en aceites vegetales.
- 4) Se demostró que la actividad antioxidante del extracto de romero obtenido en la presente investigación es comparable con la del antioxidante artificial BHA y ligeramente inferior a la del antioxidante artificial BHT en aceites vegetales; sin

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

embargo, es necesario evaluar su actividad en grasas animales y sistemas alimenticios complejos, a diferentes niveles de uso, su posible sinergismo con otros antioxidantes naturales así como su posible toxicidad, con el fin de usarlo confiadamente en la industria alimentaria y, en un momento determinado, sustituirlo por los antioxidantes artificiales.

ANEXO I

PRUEBA DEL ACIDO TIOBARBITURICO

1) REACTIVOS NECESARIOS.

- Hexano
- Acido tiobarbitúrico 0.02 M

2) PREPARACION DEL ACIDO TIOBARBITURICO 0.02 M.

En un matraz aforado de 250 ml. se colocan 1.44 g. del ácido 2-tiobarbitúrico y 50 ml. de agua destilada. Esto se somete a una vigorosa agitación con ayuda de un agitador mecánico. Después, se adiciona ácido acético glacial hasta completar dos terceras partes del volumen del matraz. La mezcla se agita vigorosamente por un periodo de tiempo de diez minutos o bien hasta que el ácido 2-tiobarbitúrico esté completamente disuelto. Finalmente se afora a 500 ml. con ácido acético glacial (8).

3) PROCEDIMIENTO.

En un tubo de ensayo de 15 ml. se pesan 0.5 g. de aceite y se agregan 5 ml. de hexano. La mezcla se agita por un periodo de 15 segundos y se adicionan 5 ml. de la solución de ácido tiobarbitúrico 0.02 M. Los tubos se colocan en baño maria a ebullición durante un periodo de 40 minutos, se enfrían y se lee la absorbancia a 532 nm. (10).

4) CALCULO DEL NUMERO DE TBA.

La concentración de sustancias reactantes con TBA puede ser calculada a partir de la ley de Beer:

$$A = E b c$$

Donde:

A = Absorbancia.

E = Coeficiente de extinción (pendiente de la curva estandar 2.085×10^5 (8)).

b = Longitud de la celda (generalmente 1 cm.).

c = Concentración molar de sustancias reactantes con TBA.

entonces:

$$c = \frac{A \text{ mmol de M}}{2.085 \times 10^5 \text{ ml de x}} \times \frac{10.6 \text{ ml de x}}{0.5 \text{ g de aceite}} \times \frac{72 \text{ mg de M}}{1 \text{ mmol de M}} \times \frac{100 \text{ g de aceite}}{1 \text{ kg de aceite}}$$

$$c = \frac{A}{2.085 \times 10^5} \times \frac{1.5264 \times 10^6 \text{ mg de M}}{\text{kg de aceite}}$$

Donde:

M = Malonaldehído

x = Cromógeno

10) BIBLIOGRAFIA

- 1) Badui Dergal Salvador. "Química de los Alimentos". 1984 ed. Alhambra Mexicana S.A. de C.V. segunda reimpresión. México pp. 161 a 202.
- 2) Branen A.L. "Toxicology and Biochemistry of BHA and BHT". 1977 J.A.O.C.S. 52:59
- 3) Brieskorn C.H; A. Fuchs; J.B. Bredenberg; J.D. Mc.Chesney and E.Wenkert. "The Structure of Carnosol". 1964 J.Org.Chem. 29:2239
- 4) Chang S.S; B. Ostric-Matijasevic; O.A.L. Hsieh and C.L. Huang. "Natural Antioxidants from Rosemary and Sage". 1977 J. of Food Science. 42:1102
- 5) Chipault J.R; G.R. Mizuno; W.O. Lundberg and J.M. Hawkins. "Antioxidant Properties of Natural Spices". 1952 Food Res. 17:46
- 6) Chipault J.R; G.R. Mizuno; W.O. Lundberg. "Antioxidant Properties of Spices in Oil-in-Water Emulsions". 1955 Food Res. 20:443
- 7) Coppens P. "The Antioxidant Advantage". 1985 Food. 7:49
- 8) Echeverria Orozco E. "Aplicación de una Metodología para Determinar la Vida de Anaquel de un Producto de Baja Humedad a Base de Carne y Grasa de Pollo". 1987 Tesis Ibero. Mexico D.F.
- 9) Enciclopedia Salvat. Tomo 11 p.2908
- 10) Eskin N.A.M. and Frenkel C. "A Simple and Rapid Method for Assessing Rancidity of Oils Based on the Formation of Hidroperoxides". 1976 J.A.O.C.S. 53:746
- 11) Events. "BHA Banned in Japan". Marzo 1983 Food Engineering
- 12) Fennema O.R; M. Karel; D.B. Lund. "Principles of Food Science". 1976 Part II. Marcel Dekker Inc. New York, N.Y. pp.139 a 203. p
- 13) Furia Thomas E. "Handbook of Food Additives" 1972 vol.1 CRC Press; Cleveland U.S.A. pp. 185-223
- 14) Furia Thomas E. "Handbook of Food Additives" 1976 vol. 2 CRC Press; Florida U.S.A.

- 15) Gray J.I. "Measurement of Lipid Oxidation: a review". 1978 J.A.O.C.S. 55:339
- 16) Houlihan C.M; C-T Ho and S.S. Chang "Elucidation of the Chemical Structure of a Novel Antioxidant Rosmaridiphenol Isolated from Rosemary". 1984. J.A.O.C.S. 61:1036.
- 17) Houlihan C.M; C-T Ho and S.S. Chang. "Structure of Rosmariquinone, a New Antioxidant Isolated from Rosemary". 1985. J.A.O.C.S. 62:96.
- 18) Inatani R; N. Nakatani; H. Fuwa and H. Seto. "Structure of Rosmanol, a New Antioxidant from Rosemary". 1981. Agric. Biol. Chem. 45:23851.
- 19) Inatani R; N. Nakatani; H. Fuwa and H. Seto. "Structure of a New Antioxidative Phenolic Diterpene Isolated from Rosemary". 1982. Agric. Biol. Chem. 46:1661.
- 20) Lundberg W.O. "Autoxidation and Antioxidants". 1961. vol. 1. Interscience Publishers. New York, N.Y. pp. 133.
- 21) Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists (A.O.A.C.). 1984. PP. 507 Y 1007.
- 22) Rodriguez Palacios F.J. "Antioxidantes Naturales". 1984. Tecnol. Aliment. 19:26.
- 23) Schultz Day and Sinnhuber. "Symposium on Foods: Lipids and Their Oxidation". 1962. AVI Inc. Westport Connecticut.
- 24) Swern D; Wiley J. and Sons. "Baileys Industrial Oil and Fat Products". 1979. New York, N.Y. pp. 432.
- 25) Wu. J.M; M-H Lee; C-T Ho and S.S. Chang. "Elucidation of the Chemical Structure of Natural Antioxidants Isolated from Rosemary". 1982. J.A.O.C.S. 59:339.