

193
Jaj.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA

**ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS TOCOFEROLES
SU USO Y DETENCION EN ALIMENTOS**

TRABAJO MONOGRAFICO DE ACTUALIZACION

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

PRESENTA:

ELVIRA RODRIGUEZ ROSAS

MEXICO, D.F.

1993

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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

Pág.

RESUMEN

INTRODUCCION	1
1. ANTIOXIDANTES GRADO ALIMENTICIO	
1.1 Generalidades	2
1.2 Características de los antioxidantes	2
1.3 Tipos de antioxidantes	3
1.4 Mecanismo de acción	4
1.5 Uso adecuado de antioxidantes	7
1.6 Degradación de grasas y aceites	7
2. TOCOFEROLES	
2.1 Bosquejo histórico	11
2.2 Estructura química	13
2.3 Propiedades físicas	16
2.4 Contenido en los alimentos	16
2.5 Actividad antioxidante	19
2.5.1 Actividad entre los tocoferoles	22
2.5.2 Comparación con otros antioxidantes	27
2.6 Sinergismo	30
2.7 Efecto pro-oxidante	37
2.8 Degradación	40

3. FORMULACIONES Y USOS	
3.1 Formulaciones	46
3.2 Uso en alimentos, fármacos y cosméticos	47
3.3 Saborizantes	51
3.4 Productos cárnicos	51
3.5 Confitería	52
3.6 Pescado y productos derivados	53
3.7 Aceites y grasas, comestibles y para freír	55
4. METODOS ANALITICOS	
4.1 Técnica de separación	57
4.2 Métodos colorimétricos	57
4.3 Métodos electroquímicos	60
4.4 Método polarimétrico	61
4.5 Análisis cromatográficos	62
5. DISCUSION	69
6. CONCLUSIONES	76
BIBLIOGRAFIA.	78

RESUMEN

En este estudio se presentan las características generales de los antioxidantes, así como su mecanismo de acción en la degradación de grasas y aceites (cap. 1). Se hace un bosquejo histórico de los tocoferoles, su importancia, estructura y propiedades; tratando en detalle su actividad antioxidante y sinergismo, para los contenidos normalmente encontrados en los alimentos, incluyendo los efectos pro-oxidante y degradativos relacionados (cap. 2).

En el capítulo 3 se resumen las referencias relacionadas a las formulaciones y se clasifican en función de su uso y alimentos de aplicación. Los métodos analíticos organizados bajo el patrón anterior, para resaltar su evolución, aplicabilidad y precisión, se incluyen en el capítulo 4. En el cap. 5 se exponen a manera de discusión las observaciones consideradas como relevantes derivadas del análisis de la información previa presentada y finalmente las conclusiones obtenidas (cap. 6) así como la bibliografía consultada para la consecución de este trabajo.

INTRODUCCION

Los tocoferoles son uno de los cinco antioxidantes mas ampliamente usados en productos alimenticios con un alto contenido lipidico, tanto a nivel mundial como nacional. Estos compuestos inhiben o retardan la oxidación evitandose la rancidez y deterioro, y a diferencia de otros antioxidantes, mejoran la calidad de un producto para consumo humano ya que están comprendidos dentro de la serie de sustancias con actividad de vitamina E, esencial para la reproducción y fertilidad.

Dada su importancia y al hecho de no existir ningún trabajo sobre el tema de 1973 a la fecha en el acervo de tesis de la biblioteca, el presente trabajo contempla como objetivos: Revisar las fuentes bibliográficas en cuanto a antioxidantes y su mecanismo de acción. Degradación de grasas y aceites. Tocoferoles, estructura química, propiedades, actividad antioxidante y temas relacionados. Aplicaciones en alimentos, formulaciones. Métodos analíticos para su detección y control. Resumir, actualizar y organizar la información existente a fin de visualizar y analizar su estatus en este campo.

1. ANTIOXIDANTES GRADO ALIMENTICIO

1.1 Generalidades (1)

Desde hace aproximadamente medio siglo los antioxidantes grado alimenticio se adicionan a las grasas y aceites o a los productos que poseen un alto contenido lipídico, con el fin de retardar o inhibir la oxidación por radicales libres, evitándose la rancidez y deterioro en el color y sabor. Durante este periodo se ha evaluado la efectividad antioxidante y la seguridad para el consumo humano de cientos de compuestos naturales y sintéticos y hasta la fecha, alrededor de veinte compuestos han cumplido con los parámetros citados y se han aprobado como aditivos alimentarios. De esos veinte sólo cinco antioxidantes se usan ampliamente en todo el mundo.

- * BHA (butil hidroxianisol)
- * BHT (butil hidroxitolueno)
- * Galato de propilo
- * TBHQ (terbutil hidroquinona)
- * Tocoferoles.

Estos productos usados en forma individual o en combinación con ácidos sinérgicos, tales como el ácido cítrico, ácido ascórbico y sus correspondientes ésteres, cumplen con las principales exigencias de un antioxidante para productos alimenticios.

1.2 Características de los antioxidantes (1,2)

Un antioxidante para alimentos debe cumplir con los siguientes requisitos esenciales:

- efectividad a bajas concentraciones
- compatibilidad con el sustrato, por ejemplo el pH del alimento.
- estabilidad durante el procesamiento del alimento: freído, horneado, secado por aspersión, extrusión, etc.
- solubilidad o dispersabilidad en el alimento.
- no conferir color, olor y sabores desagradables al producto alimenticio.
- ausencia de toxicidad para el consumidor.
- los requisitos que señala la legislación sanitaria.

1.3 Tipos de antioxidantes (2,3)

Se ha hecho una clasificación de los antioxidantes con base en el modo de acción de estos compuestos, distinguiéndose aquellos que son capaces de donar rápidamente un átomo de hidrógeno a un radical lipídico, éstos son llamados antioxidantes primarios ó únicamente antioxidantes.

El otro grupo son los antioxidantes secundarios, algunos autores les han llamado sinergistas, estos compuestos retardan la velocidad de autooxidación de los lípidos, por la conversión de radicales libres en especies estables.

Los mecanismos por los cuales operan pueden ser: ligar iones metálicos, atrapar o absorber el oxígeno, degradar los hidroperóxidos a especies no radicales, absorber la radiación UV o desactivar el oxígeno.

Antioxidantes Primarios

Tocoferoles

Goma guayacol

Galato de propilo

Butil hidroxianisol (BHA)

Butil hidroxitolueno (BHT)

2,4,6-Trihidroxibutirofenona (THBP)

4-Hidroximetil-2,6-di-ter-butilfenol

ter-Butilhidroquinona (TBHQ)

Sinergistas

Acido cítrico y citrato de isopropilo

Acido fosfórico

Acido tiopropiónico y

sus ésteres: didodecil, dilauril y dioctadecílico

Acido ascórbico y palmitato de ascorbilo

Acido tartárico

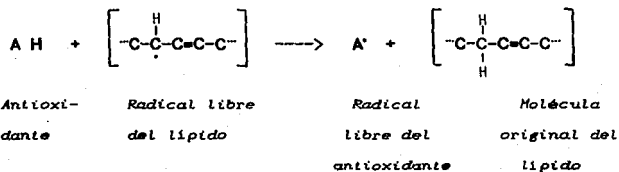
Lecitina

1.4 Mecanismo de acción (1,2)

Los antioxidantes para grasas y aceites funcionan interfiriendo en la formación de radicales libres que inician y propagan la oxidación. Las siguientes reacciones químicas describen el mecanismo antioxidante.

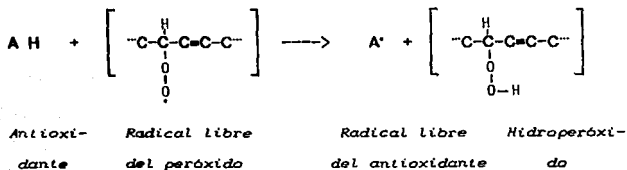
La reacción (1) ilustra como el antioxidante inhibe o retrasa la etapa de iniciación de la oxidación por radicales libres.

REACCION 1

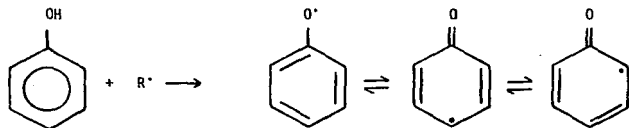


La reacción (2) ilustra como se inhibe la etapa de propagación.

REACCION 2



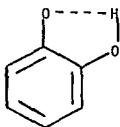
La estructura fenólica de los antioxidantes primarios grado alimenticio les permite formar radicales libres de baja energía a través de híbridos de resonancia:



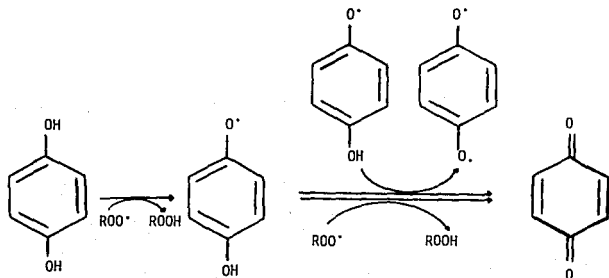
Fenol Radical libre Híbridos en resonancia estables

Los grupos sustituyentes alquilo en las posiciones 2, 4 o 6 del anillo aromático del fenol, incrementan la densidad electrónica en el grupo hidroxilo por efecto inductivo, esto trae como consecuencia un aumento en la reactividad con los radicales lipídicos.

Un nuevo grupo hidroxilo en la posición 2 o 6 del anillo fenólico produce un incremento en la actividad antioxidante, debido a la estabilidad que adquiere el radical fenoxil a través de un puente de hidrógeno intramolecular.



La actividad antioxidante de los derivados del 1,4-dihidroxibenceno se debe en parte, al hecho de que el radical semiquinoidico producido inicialmente, puede además ser oxidado hasta quinona, mediante la reacción con otro radical lipídico o puede descomponerse hasta una molécula de quinona e hidroquinona:



Hidroquinona

Quinona

1.5 Uso adecuado de antioxidantes (2)

Desde luego, la industria de alimentos no debe de reemplazar las buenas prácticas de manufactura por el uso de antioxidantes. ya que estos compuestos pueden inhibir o retardar la oxidación, pero no pueden mejorar la calidad de un producto ya oxidado. En los sistemas lipídicos, especialmente, la oxidación necesita del oxígeno y las reacciones se inician debido a un incremento de energía. Por consiguiente es importante:

- Minimizar los activadores de la oxidación exógena: almacenar en lugar frío y eliminar la luz innecesaria, especialmente la radiación UV.
- Eliminar los activadores de la oxidación endógena: eliminar o reducir las trazas de metal (Cu, Fe), pigmentos (clorofilas) o peróxidos.
- Usar materias primas de buena calidad.
- Eliminar el oxígeno tanto como sea posible y mantener la entrada de éste en niveles bajos durante el proceso y el almacenamiento.
- Utilizar contenedores y materiales de empaque adecuados.

1.6. Degradación de grasas y aceites (1,3)

La degradación de las grasas y los aceites alimenticios ocurre inicialmente a partir de dos reacciones químicas: hidrólisis y oxidación.

Hidrólisis

La hidrólisis de grasas y aceites ocurre cuando el agua

reacciona con el triglicérido para formar glicerol, mono y diglicéridos y ácidos grasos libres. La hidrólisis de las grasas y los aceites naturales (animales y vegetales) se cataliza frecuentemente por las enzimas lipasas, pero son desactivadas por las condiciones térmicas de refinación del aceite.

Muy frecuentemente este tipo de degradación ocurre durante el procesamiento de los alimentos a altas temperaturas, por ejemplo, en el freído de alimentos con un alto contenido de agua, como son las papas.

Como consecuencia de la hidrólisis de las grasas y aceites se observa:

- disminución del punto de humo,
- formación de espuma durante el freído.
- corrosión del equipo de proceso, factor para la producción de ácidos grasos libres, y
- formación de sabores amargos y desagradables debido a los ácidos grasos libres (especialmente cuando se usan los aceites de coco y almendra de palma); debido a esto, se le ha llamado rancidez hidrolítica.

Cabe señalar que ni los antioxidantes ni otro aditivo usado en la industria alimentaria pueden corregir el problema de hidrólisis lipídica.

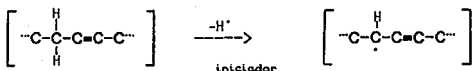
Oxidación

La oxidación de las grasas y aceites es el problema más frecuentemente asociado con la producción, almacenamiento y uso de estos productos. Este tipo de daño se inicia con la formación de radicales libres debido a la exposición de los lípidos al

calor, la luz, los iones metálicos y el oxígeno.

Para explicar la oxidación de las grasas y aceites se ha propuesto un mecanismo que incluye tres pasos, estos son: iniciación, propagación y terminación.

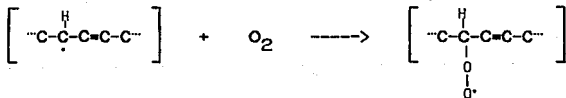
Esta reacción de oxidación ocurre en los grupos metileno adyacentes al doble enlace carbono-carbono (posición alílica):



Lípido

Radical libre del lípido

La oxidación prosigue al reaccionar el radical libre de la grasa con el oxígeno para formar el radical libre del peróxido:

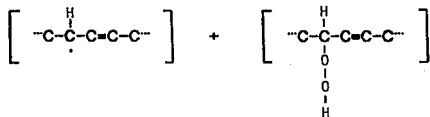
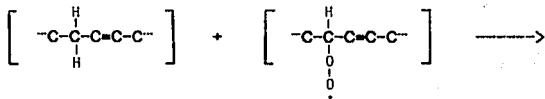


Radical libre del lípido

Radical libre del peróxido

Enseguida el radical libre del peróxido extrae un radical hidrógeno de otra molécula de grasa para formar un hidroperóxido y otro radical libre de la grasa. Esta reacción constituye la etapa de propagación y se caracteriza entre otras

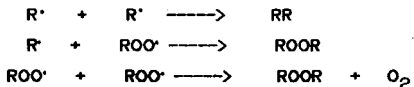
cosas por efectuarse en cadena:



Radical libre de
la grasa

Hidroperóxido

En la tercera etapa conocida como terminación, se forman polímeros debido a la reacción de dos moléculas de radicales libres, que pueden ser de igual o diferente especie:



2. T O C O F E R O L E S

2.1 Bosquejo Histórico (4,5,6,7)

El nombre de vitamina proviene del griego "vita" que significa vida y "amina" es referido al grupo de compuestos químicos aminas, al cual pertenece la tiamina (B_1) que fue el primer factor identificado con características relativamente puras.

Podría definirse la palabra vitamina como aquél grupo de moléculas orgánicas que son indispensables como tales para los procesos metabólicos del cuerpo, ya que éste es incapaz de sintetizarlas en cantidades adecuadas y que no son los aminoácidos ni los ácidos grasos esenciales, que también son indispensables.

Las vitaminas se han clasificado en dos grandes grupos, las vitaminas hidrosolubles y las vitaminas liposolubles. En el primer grupo quedan comprendidas la vitamina C y las que conforman el complejo B; dentro del segundo grupo se encuentran las vitaminas A, D, K y E, esta última objeto de estudio.

Existen características que diferencian a ambos grupos, por ejemplo las vitaminas liposolubles se absorben en el intestino junto con otros lípidos y llegan a acumularse en cantidades importantes en el hígado. En cambio, las vitaminas hidrosolubles se absorben con dificultad en el intestino y no se acumulan en el organismo en gran cantidad.

Las vitaminas sirven como coenzimas o precursoras de éstas, cuya función es catalizar las reacciones en la fisiología

corporal, por tal motivo se requieren en cantidades muy pequeñas.

La vitamina E comprende una serie de compuestos denominados tocoferoles y tocotrienoles. En la naturaleza se encuentran ocho derivados de tocoferol, seis son derivados del tocol y dos del tocotrienol. La diferencia entre estos dos tipos de moléculas es que el tocotrienol tiene tres dobles enlaces en la cadena lateral.

En el año de 1922 Evans y Bishop determinaron la presencia de un compuesto responsable de la reproducción de ratas, trece años más tarde Evans y los Emerson obtuvieron la vitamina E a partir de la fracción insaponificable del aceite de germen de trigo. A estos investigadores se debe el nombre de tocoferol cuyo significado proviene de "tokos" que significa alumbramiento o parto; "phera", llevar o transportar y "ol" alcohol. En 1938 Karrer y colaboradores sintetizaron la vitamina E.

La vitamina E es un antioxidante biológico que protege a los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares contra la acción de moléculas peroxidantes tales como peróxidos, superóxido y radicales libres portadores de oxígeno.

La carencia de vitamina E lleva a pérdida de fertilidad en el hombre y es causa de aborto en la mujer, se presenta cuando hay una absorción deficiente y crónica de las grasas que se manifiesta por trastornos gastrointestinales como náuseas y dolor abdominal, debido posiblemente a la acumulación de un pigmento en el intestino delgado. Existe también una pérdida de tejido muscular; en niños recién nacidos o lactantes los

eritrocitos son más propensos a la hemólisis, debido al ataque de los radicales libres sobre los ácidos grasos poliinsaturados de la membrana.

La fuente natural más abundante de los tocoferoles son los aceites vegetales: aceite de germen de trigo (el de más alta concentración), le siguen el aceite de maíz, el de semilla de algodón y el aceite de girasol, entre otros. La vitamina E también se encuentra en las verduras de hoja verde (lechuga, alfalfa), nueces y cereales. En el tejido animal, el hígado es el que presenta mayor contenido de esta vitamina, aunque en general esta fuente es baja en tocoferol, dentro de este grupo se contempla la carne, leche, mantequilla y la yema de huevo.

2.2 Estructura química (2,4)

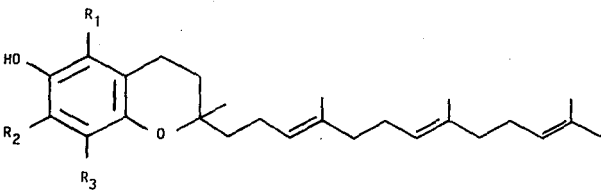
En la naturaleza se han encontrado ocho diferentes sustancias que tienen actividad de vitamina E. Estas sustancias pertenecen a dos familias con los nombres genéricos de "tocoles" y "tocotrienoles". Los miembros de cada familia se designan con α , β , γ , ó δ dependiendo del número y posición de los grupos metilo unidos al anillo cromanol.

En los tocoles (tabla 2.1) la cadena lateral es saturada e insaturada en los tocotrienoles (tabla 2.2). Las estructuras de los tocoferoles (tocoles) indican tres centros de asimetría en C-2, C-4' y C-8'. Los tocotrienoles poseen un centro de asimetría en C-2. Por lo tanto, para cada tocoferol y tocotrienol existen 8 y 2 estereoisómeros respectivamente, en base a, estos centros quirales.

Tabla 2.1

ESTRUCTURA QUÍMICA DE TOCOFEROLES					
Compuesto	Fórmula	Sustituyentes			P.M.
		T o c o f e r o l e s			
		R_1	R_2	R_3	
* Tocol	$C_{28}H_{44}O_2$	H	H	H	388.64
* 8-Metilocol (δ -Tocoferol)	$C_{27}H_{46}O_2$	H	H	CH_3	402.67
* 5,8-Dimetilocol (β -Tocoferol)	$C_{29}H_{48}O_2$	CH_3	H	CH_3	416.69
* 7,8-Dimetilocol (γ -Tocoferol)	$C_{28}H_{48}O_2$	H	CH_3	CH_3	416.69
* 5,7,8-Trimetilocol (α -Tocoferol)	$C_{29}H_{50}O_2$	CH_3	CH_3	CH_3	430.72

Tabla 2.2

ESTRUCTURA QUÍMICA DE TOCOFEROLES					
Compuesto	Fórmula	Sustituyentes			P.M.
Tocotrienoles					
					
* 8-Metiltocotrienol (δ-Tocotrienol)	$C_{27}H_{40}O_2$	R_1 H	R_2 H	R_3 CH ₃	396.62
* 5,8-Dimetiltocotrienol (β-Tocotrienol)	$C_{28}H_{42}O_2$	CH ₃	H	CH ₃	410.65
* 7,8-Dimetiltocotrienol (γ-Tocotrienol)	$C_{28}H_{42}O_2$	H	CH ₃	CH ₃	410.65
* 5,7,8-Trimetiltocotrienol (α-Tocotrienol)	$C_{29}H_{44}O_2$	CH ₃	CH ₃	CH ₃	424.67

Este arreglo espacial de los compuestos influye en su actividad biológica. El 2R, 4'R, 8'R- α -tocoferol natural es aproximadamente 35% más activo que el dl- α -tocoferol sintético. Estos hechos deben considerarse en el cálculo del contenido de vitamina E en los alimentos.

Para designar a los compuestos naturales se les antepone la letra d, letra que se refiere a la ordenación en torno al átomo de carbono 2 asimétrico, es decir, pertenecen a la serie d. El α -tocoferol sintético es dl- α -tocoferol.

2.3 Propiedades físicas (2)

En la tabla 2.3 se describen las propiedades físicas de los tocoferoles comercialmente importantes.

2.4 Contenido en los alimentos (2,9)

En los alimentos de origen animal sólo el α -tocoferol se encuentra en cantidades significativas, dependiendo de la alimentación de los animales. (Tabla 2.4)

Los alimentos vegetales contienen en sus lípidos cantidades importantes de diferentes tocoferoles y tocotrienoles. Los cereales y productos a base de éstos, semillas de aceite, nueces y vegetales tales como ejotes, frijoles y zanahorias son fuentes ricas en tocoferoles y tocotrienoles.

Los contenidos de tocoferoles pueden depender mucho de la variedad y de las condiciones de crecimiento de la planta y del proceso de almacenamiento del aceite. Bajo buenas prácticas de manufactura, el contenido total de tocoferol en aceite se

Tabla 2.3

PROPIEDADES FISICAS DE TOCOFEROLES COMERCIALMENTE IMPORTANTES			
Propiedad	α	γ	δ
Fórmula	$C_{29}H_{50}O_2$	$C_{28}H_{48}O_2$	$C_{27}H_{46}O_2$
Peso Molecular	430.72	418.69	402.67
Índice de Refracción n_D^{20}	1.503-1.507	1.503-1.507	1.500-1.504
Viscosidad (cP) (20°C)	5000-6000 cP		
Absorción UV			
λ max. /EtOH (nm)	292	298	297-298
$E_{1cm}^{1\%}$ mín. (nm)	255	257-258	257
Descripción	Los tocoferoles son sustancias aceitosas claras, viscosas, de color amarillo pálido, casi sin olor, se oxidan y oscurecen por exposición a la luz y al aire.		
Solubilidad	Insoluble en agua. Miscible en cualquier proporción con aceites vegetales, etanol, éter, cloroformo y acetona.		

Tabla 2.4

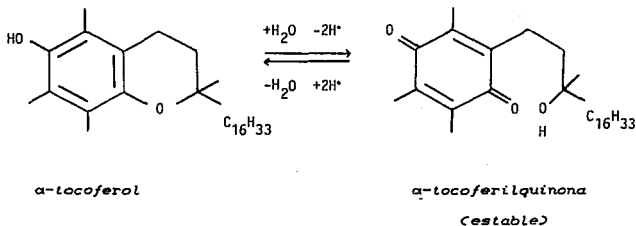
CONTENIDO APROXIMADO DE α -TOCOFEROL
 EN
 ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL

Alimento	α -Tocoferol (mg/Kg)
Carne roja	6
pollo	4
carne de puerco	5
grasa de cerdo	12
huevos	5-11
camarón	7
mantequilla	10-33
leche de otaño	1.2

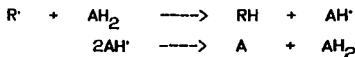
reduce a no más del 30-40% durante el refinamiento (neutralización, blanqueo y desodorización). La Tabla 2.5 muestra el contenido de tocoferoles en aceites vegetales y productos derivados.

2.5 Actividad antioxidante (2)

La actividad antioxidante de los tocoferoles se basa principalmente en un sistema redox "tocoferol-tocoferilquinona".



Los tocoferoles (AH_2) extinguen a los radicales libres (R') de acuerdo al esquema general:

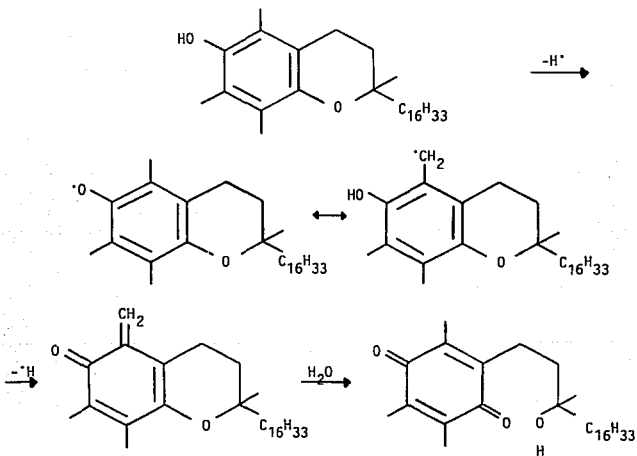


El resultado de la acción es una molécula regenerada del ácido graso (RH). Después de la reacción de dos moléculas radicales de tocoferil semiquinona (AH'), se forma una molécula de tocoferil quinona (A) y se regenera una molécula de tocoferol. La eliminación de radicales peróxido pueden sufrir la misma reacción.

Tabla 2.5

ACEITES:	CONTENIDO DE TOCOFEROLES Y				TOCOTRIENOLES				
	TOTAL DE TOCOFEROL (mg/kg)	TOCOFEROLES (mg/Kg)				TOCOTRIENOLES (mg/Kg)			
		alfa	beta	gama	delta	alfa	beta	gama	delta
coco	5-10	-	5	5	5	trazas	1-20	-	
algodón	40-560	-	270-410	0	-	-	-	-	
maíz	60-260	0	400-900	1-50	-	0	0-240	0	
germen de maíz	300-430	1-20	450-790	5-60	-	-	-	-	
olivo	1-240	0	0	0	-	-	-	-	
palma o senegal	180-260	trazas	320	70	120-150	20-40	260-300	70	
cacahuete	80-330	-	130-590	10-20	-	-	-	-	
colza o nabo	180-280	-	390-590	10-20	-	-	-	-	
cártamo	340-450	-	70-190	230-240	-	-	-	-	
soya	30-120	0-20	250-930	50-450	0	0	0	-	
girasol	350-700	20-40	10-50	1-10	-	-	-	-	
nuez de castilla	580	-	590	450	-	-	-	-	
germen de trigo	560-1200	660-810	260	270	20-90	80-190	-	-	
avena	523								
MARGARINAS:									
semisuaves	530								
suaves	610								
duras	290								

El mecanismo de oxidación del α -tocoferol con hidroperóxidos del ácido linoleico se ha estudiado en detalle: la secuencia incluye varias etapas. La primera es, después de la liberación de un átomo de hidrógeno, la formación de un radical libre α -tocoferil, enseguida hay una segunda liberación de un átomo de hidrógeno para dar metilentocoferilquinona. Este último compuesto es inestable y da origen finalmente a la α -tocoferilquinona, como producto principal.



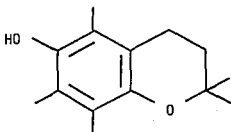
Las rutas de oxidación de tocoferoles dependen de sus condiciones. La reacción entre dos radicales puede conducir a a dímeros de α -tocoferol que poseen nuevamente propiedades antioxidantes. También se han sugerido las reacciones de

dismutación basadas en radicales que producen metiltocoferilquinona y tocoferol.

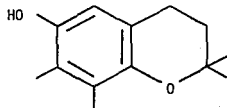
2.5.1 Actividad entre los tocoferoles

Se han hecho estudios para conocer la actividad antioxidante que presentan las formas más comunes del tocoferol: alfa (α), beta (β), gamma (γ) y delta (δ).

Para conocer la actividad del α -tocoferol se utilizó el 2,2,5,7,8-pentametil-6-hidroxicromano, y para representar al γ -tocoferol se empleó al 2,2,7,8-tetrametil-6-hidroxicromano; el sustrato sobre el cual actuaron fue el ácido linoleico así como su éster metílico.



2,2,5,7,8-pentametil-
6-hidroxicromano



2,2,7,8-tetrametil-
6-hidroxicromano

En este estudio se observó que los productos de la oxidación del α -hidroxicromano no son afectados por las condiciones de reacción (37 a 47 $^{\circ}$ C). Por otro lado, los productos del γ -hidroxicromano mostraron una elevada actividad antioxidante, de manera que el γ -tocoferol es un antioxidante superior al α -tocoferol debido a la mayor estabilidad y

actividad antioxidante de sus productos de oxidación (10).

Se comparó la actividad antioxidante del α -, β -, γ - y δ -tocoferol, el sustrato fue linoleato de metilo en solución homogénea. Cada uno de los tocoferoles mostraron ser efectivos antioxidantes, se consumieron a la misma velocidad y suprimieron la oxidación por el mismo periodo, los radicales cromaniloxil derivados a partir de su correspondiente tocoferol tuvieron una estabilidad variable ya que, disminuyeron en el siguiente orden: $\alpha > \beta = \gamma > \delta$ -cromaniloxil.

En las mismas condiciones de reacción se demostró que el α -tocoferol reacciona rápidamente con cada uno de los radicales β -, γ -, y δ -cromaniloxil, para formar el correspondiente radical α -cromaniloxil y el β -, γ -, y δ -tocoferol.

Al usar los cuatro tocoferoles en una mezcla, el primero en consumirse fue el α -tocoferol, después la forma β y γ . El δ -tocoferol empezó a disminuir después de que la mayor parte de α -, β - y γ -tocoferol ya se habían consumido (11).

En general el orden de efectividad antioxidante de los tocoferoles es el siguiente: delta > gamma > beta > alfa. Este orden algunas veces puede variar dependiendo del sustrato y otras condiciones como la temperatura (8).

El eicosapentaenoato de etilo se almacena sin cambio a a 50 °C durante 10 días con 80 ppm de α -tocoferol; contra 2 días cuando se usa δ -tocoferol (12).

La actividad antioxidante de los tocotrienoles se estudió adicionando 400 ppm de vitamina E (composición: 21.9% de α -tocoferol, 31.1% de α -tocotrienol, 37.7% de γ -tocotrienol y 9.3% de δ -tocotrienol), a la oleína de palma

Céster metilico) y sobre oleína de palma refinado, blanqueado y desodorizado.

En dicho estudio se encontró que el orden de actividad antioxidante de los tocotrienoles es: γ -tocotrienol > δ -tocotrienol > α -tocotrienol. La actividad del γ -tocotrienol es alrededor de dos veces la actividad de α -tocotrienol (13).

El aceite de maíz, es un aceite alimenticio aunque de menor grado comercial. Se obtiene del germen del grano de maíz como un subproducto en la obtención del almidón de este grano. Es un aceite de los más altamente insaturados y es poco propenso a la oxidación (8).

En un estudio realizado en el aceite de maíz, se comprobó que existe mayor actividad antioxidante en mezclas de α -, γ - y δ - análogos que cuando se usan los tocoferoles por separado. En estas mezclas el α -análogo tiene una descomposición más rápida que el γ - y δ -tocoferol (14).

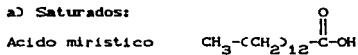
El aceite de palma o de senegal (talba 2.8) es semisólido a temperatura ambiente, se obtiene del fruto de la palma. Es altamente saturado y resistente a la oxidación pero es susceptible de hidrólisis debido a la humedad y a la acción de las enzimas presentes en la pulpa de la fruta, previo a la extracción del aceite (8).

Se estudió el efecto que presenta el α -, γ - y δ -tocoferol a una concentración de 0.03 - 0.07% en el aceite de senegal, usado para freír trozos de papa. Los tres análogos presentaron un marcado efecto antioxidante. Por otro lado se determinó que el α -tocoferol disminuyó marcadamente su concentración en el aceite que se usó por varias ocasiones, pero

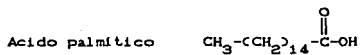
Tabla 2.6

ACIDOS GRASOS MAS COMUNES EN GRASAS Y ACEITES (FUENTE NATURAL)

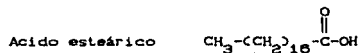
a) Saturados:



(Aceite de almendra)

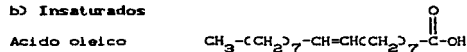


(Aceite de palma o senegal)

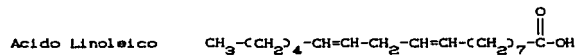


(Sebo de res)

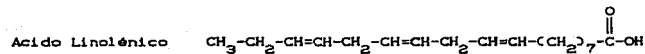
b) Insaturados



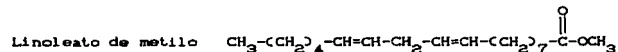
(Aceite de cacahuete)



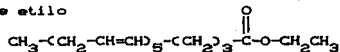
(Aceite de cártamo)



(Aceite de soya)



Eicosapentaenoato de etilo



el decremento en γ - y δ -tocoferoles fue poco (15).

El aceite de soya es extraído de las semillas de la leguminosa. Es altamente insaturado y contiene 8% de ácido linolénico, es susceptible a la rancidez oxidativa y reversión del sabor (8).

La actividad antioxidante de los tocoferoles en el aceite de soya puede resumirse en el siguiente orden: α - < β - < γ - < δ -tocoferol. Para el aceite de avena la actividad antioxidante fue: β -tocoferol < β -tocotrienol < α -tocoferol, α -tocotrienol. La actividad antioxidante de los isómeros del tocoferol a una temperatura en particular depende del tipo de aceite y de la naturaleza de otras sustancias presentes (16).

Los cereales no son considerados como alimentos grasos puesto que están constituidos principalmente de carbohidratos y proteínas, con un bajo contenido de grasa, aceite o materia lipídica. Estos componentes grasos pueden ser altamente insaturados y ser propensos a la oxidación de tal manera que causen la rancidez oxidativa o cualquier otro deterioro que pueda ser de importancia relevante (8).

Se ha reconocido que la rancidez producto de la degradación oxidativa, hidrolítica y enzimática en los cereales ocurre después de la molienda de los granos, etapa requerida para la producción de harina, dado que se destruye el equilibrio en el metabolismo de la semilla (8).

El deterioro de lípidos en los cereales se debe principalmente a la hidrólisis y a la oxidación, en consecuencia hay un cambio en su sabor (8).

Para prevenir el deterioro en el sabor de las galletas de harina de arroz, se utilizó una mezcla de tocoferoles a una concentración de 100-200 ppm. Esta mezcla integrada por α -, γ - y δ -tocoferol en una relación de 3:65:32, mostró la mayor actividad antioxidante. Como resultado se previno la generación de sabores desagradables en las galletas almacenadas durante 2 días a 60 °C bajo la irradiación de luz U.V. (17).

En otro estudio, se encontró que el δ -tocoferol presenta mayor efecto antioxidante en la manteca de cerdo. Esta se utilizó en freír trozos de papa. Le sigue el γ -tocoferol y por último el α -tocoferol. También se comprobó una mayor efectividad al adicionar δ -tocoferol al 0.05% que a una concentración del 0.02%

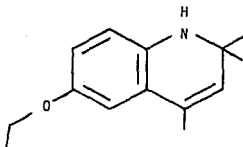
Al probar una mezcla con los tres tocoferoles anteriores, se observó un mayor efecto antioxidante conforme disminuía la forma alfa. La velocidad de desaparición de los tocoferoles fue: $\alpha > \gamma > \delta$ (18).

2.5.2 Comparación con otros antioxidantes

Para retardar la degradación oxidativa del aceite de aguacate se probaron tres antioxidantes a razón de 250 ppm, estos son galato de propilo, α -tocoferol y etoxiquin. Se experimentó sometiendo el aceite a dos condiciones, una en la que se almacenó en la oscuridad a 60°C y la otra, se expuso a la luz del día en un cuarto.

El grado de oxidación se monitoreó midiendo el valor de peróxido y de anisidina. Se encontró que el etoxiquin y el

α -tocoferol mostraron una actividad antioxidante pobre, en contra de lo observado por el galato de propilo, el cual aumentó en gran proporción la estabilidad del aceite almacenado en el cuarto oscuro a 80 °C. Este compuesto no presentó el mismo efecto en el aceite expuesto a la luz del día (19).



Etoxiquin

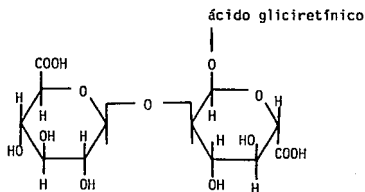
En otro estudio se determinó el antioxidante más efectivo en retardar la degradación del aceite de soya que se usó para freír papas. Los compuestos a que se hace referencia son el "anoxomer" a una concentración del 0.02%, el acetato de *dl*- α -tocoferol al 0.1% y un extracto alcohólico de romero o salvia al 0.1%.

Se encontró que el acetato de tocoferol fue un antioxidante inefectivo, mientras que el anoxomer presentó la mayor actividad antioxidante (20).

En la estabilización del aceite de palma al calentamiento a 250°C durante una hora, se probaron diversos compuestos tales como tocoferoles, ácido gálico y el residuo después de la extracción de gliciricina, así como la mezcla de todos ellos. En cada una de las pruebas se determinó el tiempo del valor 100 de peróxido (T_{100}).

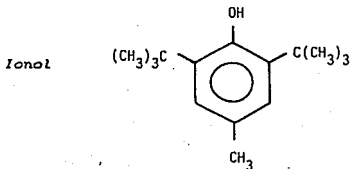
Las concentraciones finales de los antioxidantes, en el

aceite. fueron: derivado-licorice 0.01%, tocoferoles 0.04% y ácido gálico 0.004%. En los resultados se observó que la mezcla de los antioxidantes tuvo un valor de T_{100} de 85 horas en comparación con 38, 46 y 42 horas respectivamente, al utilizar los antioxidantes por separado (21).



Gliciricina (glucósido del ácido gliciretínico)

En otro estudio donde el objetivo era mantener la calidad de la grasa usada en confitería, almacenada a 45 °C durante 20 días, se encontró que el ácido ascórbico a una concentración de 0.02% o caseína al 10.05% fueron satisfactorios hasta el séptimo u octavo día y después su actividad antioxidante disminuyó. El tocoferol al 0.01% tuvo una actividad relativamente pobre. En cambio la grasa que contenía ionol al 0.02% con o sin ácido cítrico, fue un efectivo antioxidante.



Se hizo una prueba en confitería donde se confirmó el efecto antioxidante del ionol, usado a la misma concentración (0.02%). El resultado fue que el dulce fabricado con la grasa que contenía el ionol mantuvo su calidad durante más tiempo que el dulce control (22).

La estabilidad a la oxidación de productos farmacéuticos a base de aceite de pescado encapsulado, se ha comparado utilizando galato de dodecilo y la vitamina E, cuyas condiciones de almacenamiento fueron a temperatura ambiente durante aproximadamente un año.

Se encontró que todos los productos mostraron poca oxidación, pero que aquellos estabilizados por galato de dodecilo registraron menor oxidación que al usarse la vitamina E. (23).

2.6 Sinergismo

Los sinergistas son sustancias que, a diferencia de los antioxidantes quienes retardan o previenen los procesos de oxidación, potencian la actividad de dichos antioxidantes, sin ser ellos antioxidantes.

Los sinergistas pueden mejorar la efectividad antioxidante mediante uno o más de los siguientes mecanismos:

- 1) proporcionar un medio ácido para mejorar la estabilidad de antioxidantes primarios, grasas y aceites,
- 2) regenerar antioxidantes primarios,
- 3) quelar y desactivar contaminantes metálicos pro-oxidantes tal como el fierro y cobre,

4) atrapar oxígeno (ácido ascórbico).

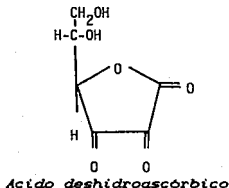
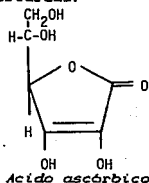
El efecto sinergista permite una reducción considerable en la cantidad de antioxidante adicionado a las formulaciones alimenticias, con esto se consigue una reducción en los costos y menor posibilidad de tener efectos indeseables en el producto alimenticio. Por razones prácticas los industrializadores de alimentos prefieren las mezclas sinérgicas que a los antioxidantes individuales.

Los sistemas sinérgicos con el tocoferol de tipo ácido más importantes son el ácido cítrico y su éster, citrato monoglicérido; y el ácido L-ascórbico o vitamina C y su éster, palmitato de ascorbilo.

* Efecto sinergista del ácido ascórbico y sus ésteres (2)

El ácido ascórbico y el palmitato de ascorbilo, cuya función es eliminar el oxígeno de las soluciones, muestran un mecanismo antioxidante totalmente diferente al de los antioxidantes fenólicos.

El ácido ascórbico se oxida hasta ácido deshidroascórbico cuando funciona como atrapador de oxígeno, por ello es importante que las posiciones 2 y 3 deban estar insustituídas.



Se han informado observaciones directas de la interacción de α -tocoferol y ácido ascórbico, los cuales mostraron actuar sinérgicamente. El α -tocoferol actúa como antioxidante primario y el radical α -tocoferil resultante reacciona con el ácido ascórbico para regenerar al α -tocoferol (24). El radical α -tocoferil generado por el radical estable 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) (estructura en tabla 2.7), desaparece muy rápido cuando se mezcla con el ácido ascórbico (25).

En otro estudio se comprobó la desaparición del α -tocoferol y ácido ascórbico en la oxidación del linoleato de metilo, iniciado con 2,2'-azobis (2,4-dimetilvaleronitrilo). Se observó que cuando el α -tocoferol y el ácido ascórbico se usan solos, desaparecen linealmente con el tiempo. Sin embargo cuando se usa una mezcla de ellos, se consume primero el ácido ascórbico y el α -tocoferol empieza a consumirse una vez que el ácido ha desaparecido.

Estos resultados sugirieron que el α -tocoferol elimina el radical peroxilo del linoleato de metilo más rápidamente que el ácido ascórbico, pero el radical α -tocoferil reacciona con el ácido ascórbico para generar el α -tocoferol (26).

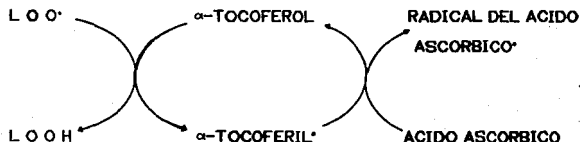
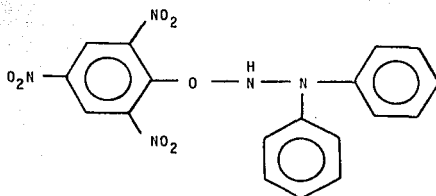


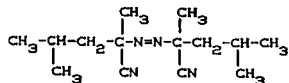
Tabla 2.7

INDICADORES DE RADICALES

2,2-difenil-1-picrilhidrazil.

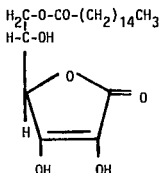


2,2'-azobis(2,4-dimetilvaleronitrilo)



Se encontró un marcado efecto sinérgico entre el ácido L-ascórbico con el α -, γ - y δ - tocoferol al usarse sobre el eicosapentaenoato de etilo como sustrato. Pero el uso combinado de estos puede ser inefectivo en los aceites marinos altamente insaturados (27).

En alimentos grasos el palmitato de ascorbilo resulta ser más efectivo que el ácido ascórbico, debido a la gran solubilidad que presenta en la fase lipídica.



Palmitato de ascorbilo

(S-O-palmitoil-L-ascorbato)

Un aditivo compuesto de palmitato de ascorbilo, dl- α -tocoferol y lecitina, presenta efecto sinérgico. Al adicionarse a la grasa a una concentración de 1000 ppm y almacenarla en frío (5-10 °C) los resultados obtenidos mostraron que el valor de peróxido se mantuvo en menos de 0.08 meq.O/Kg de grasa durante 12 meses, en cambio para la grasa anhidra de leche que no contenía el aditivo, los valores de peróxido se incrementaron de 0.106 a 0.6 meq.O/Kg de grasa (28,29).

Aunque el ácido ascórbico puede funcionar como atrapador de oxígeno, es particularmente efectivo en combinación con antioxidantes primarios, tales como tocoferoles. Una explicación a ello es que el ácido ascórbico actúa por

descomposición de los hidroperóxidos lipídicos a productos no radicales, pero también puede ser efectivo en regenerar al tocoferol, reduciendo el radical tocoferoxilo o el tocoquinona.

* Efecto sinergista del ácido cítrico (2)

El ácido cítrico, usado ampliamente en alimentos es un agente quelante más débil que el EDTA. Sin embargo es muy efectivo en retardar la degradación oxidativa de lípidos en alimentos y comúnmente se adiciona a los aceites vegetales después de su desodorización.

El efecto antioxidante del ácido cítrico disminuye sobre la esterificación de los grupos carboxílicos, mientras que la esterificación del grupo hidroxilo no tiene efecto. De ello se deduce que, los grupos carboxilo están involucrados en la quelación de los metales iónicos.

Se demostró que la adición de ácido cítrico a la grasa de cerdo y al aceite de palma, presenta poco efecto antioxidante. Los resultados indicaron que el efecto de los ácidos cítrico, málico y succínico es el esperado con base en la función de los ácidos como desactivadores de metales. El citrato de monoacilglicerilo y citrato de isopropilo mostraron un pequeño o ningún efecto sinergista del ácido cítrico con la grasa de cerdo y con el aceite de palma, aunque pueden actuar también como desactivadores de metales (30).

En una margarina como modelo de estudio, preparada a partir de grasa de cerdo y suplementada con vitamina A y β -caroteno. Se encontró que el citrato de isopropilo (tabla 2.8)

Tabla 2.8

FORMULAS QUIMICAS DE SINERGISTAS	
Acido citrico	$ \begin{array}{c} \text{CH}_2\text{COOH} \\ \\ \text{HO}-\text{C}-\text{COOH} \\ \\ \text{CH}_2\text{COOH} \end{array} $
Citrato de monoacilglicerilo	$ \begin{array}{c} \text{CH}_2\text{COO}-\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH} \\ \\ \text{HO}-\text{C}-\text{COO}-\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2\text{COO}-\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH} \end{array} $
Citrato de isopropilo	$ \begin{array}{c} \text{CH}_2\text{COO}-\text{CH}(\text{CH}_3)_2 \\ \\ \text{HO}-\text{C}-\text{COO}-\text{CH}(\text{CH}_3)_2 \\ \\ \text{CH}_2\text{COO}-\text{CH}(\text{CH}_3)_2 \end{array} $
Estearato de ascorbilo	$ \begin{array}{c} \text{H}_2\text{C}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-(\text{CH}_2)_{16}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{C} \\ / \quad \backslash \\ \text{H} \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{OH} \quad \text{OH} \end{array} $
Acido málico	$ \begin{array}{c} \text{H} \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{OH}-\text{C}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{C}-\text{OH} \\ \quad \\ \text{H} \quad \text{O} \end{array} $
Acido succínico	$ \begin{array}{c} \text{H} \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{H}-\text{C}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{C}-\text{OH} \\ \quad \\ \text{H} \quad \text{O} \end{array} $

presenta un pequeño efecto contra la degradación oxidativa de este alimento. Por otro lado, el ácido cítrico y el estearato de L-ascorbilo mostraron tener un efecto sinérgico con una mezcla d-tocoferoles en la estabilidad de dicha margarina. Un efecto similar se presentó al adicionar galato de propilo o ter-butilhidroquinona a la mezcla de tocoferoles, pero éstos compuestos producen un oscurecimiento a la margarina durante su almacenamiento (31).

* Efecto sinérgico con aminoácidos

Las proteínas y los hidrolizados de proteínas tienen efectos sinérgicos con antioxidantes, así también se conoce que los aminoácidos presentan efecto sinérgico.

Se encontró que la carne Antarctic Krill (*Euphausia superba*) tiene efecto antioxidante frente a ciertos alimentos. Al analizar la carne se encontró que su principio antioxidante consiste de α -tocoferol y una mezcla sinérgica de aminoácidos (32).

2.7 Efecto pro-oxidante (2)

En la figura 2.1 se observa que la actividad de algunos antioxidantes no se incrementa linealmente al aumentar la cantidad del aditivo. A niveles suficientemente altos de adición se llega a presentar el efecto pro-oxidante. Entre los antioxidantes naturales este hecho tiene que considerarse principalmente con el α - y β -tocoferol, mientras que γ - y δ -tocoferol no producen un efecto pro-oxidante en el rango de

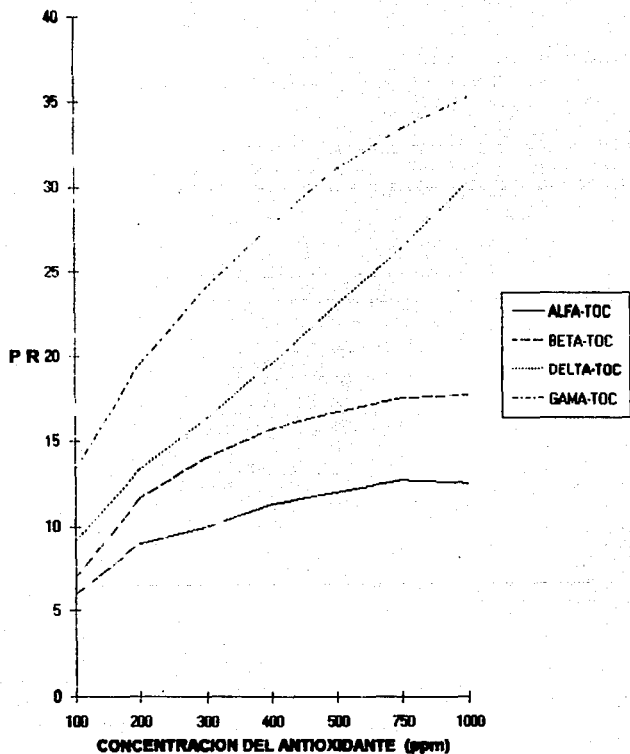
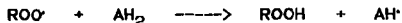


Fig. 2.1 Relación entre la concentración del antioxidante y su actividad en la grasa de cerdo.
 PR: Proporción del periodo de inducción

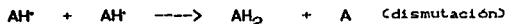
niveles reales de adición.

Las reacciones se pueden resumir como sigue:

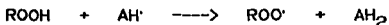
+ *Actividad antioxidante*. (a baja concentración de tocoferol):



+ *Inactivación de radicales*:



+ *Actividad pro-oxidante* (alta concentración de tocoferol):



ROOH: hidroperóxidos

ROO[•]: radicales peróxido

AH₂ : antioxidante (tocoferol)

AH[•] : radical del antioxidante.

Se investigó la influencia de varias concentraciones del α -tocoferol en grasas vegetales y animales y se concluyó que a bajas cantidades (< 800-700 mg/Kg grasa) no muestra actividad pro-oxidante a temperatura ambiente. Cuando la temperatura se incrementa en tal sistema, la formación de radicales del antioxidante se acelera más rápidamente que la oxidación del sustrato. Por consiguiente el antioxidante se convierte en un pro-oxidante por el incremento en la descomposición de hidroperóxidos (33).

En el aceite de soya purificado se estudiaron los efectos de la adición de 0, 100, 250, 500 y 1000 ppm de α -, γ -, ó δ -tocoferol a una temperatura de 55 °C. Se concluyó que los tocoferoles actúan como antioxidantes y pro-oxidantes

dependiendo de su concentración. La concentración óptima de α -, γ -, δ -tocoferoles para incrementar la estabilidad del aceite fue de 100, 250 y 500 ppm respectivamente. Los tocoferoles presentan un importante efecto pro-oxidante a elevadas concentraciones (34).

En sistemas de modelo acuosos, el efecto pro-oxidante del α -tocoferol durante la oxidación del ácido linoleico, depende de dos factores:

- el disolvente: únicamente en sistemas acuosos se observó un efecto pro-oxidante considerable.
- la concentración: debajo de 5 mmol de α -tocoferol/litro de ácido linoleico, no se presentó efecto pro-oxidante (35, 36).

En un estudio se investigaron los inhibidores de la actividad pro-oxidante del α -tocoferol. Se encontró que podría actuar por dos diferentes rutas: mediante la quelación de trazas de metales pro-oxidantes (por ejemplo aminoácidos, EDTA) y/o por la regeneración del α -tocoferol (CH_3PO_4 , ácido malónico y cítrico, cisteína y los antioxidantes comunes), de manera que reduzcan la concentración del radical cromanoxido, el cual podría estar involucrado en la actividad pro-oxidante (37).

2.8 Degradación (2)

Se han hecho muchos experimentos relacionados a la degradación de antioxidantes bajo condiciones de autooxidación de grasas y aceites, por ejemplo la oxidación térmica, oxidación por el método de activación de oxígeno y la oxidación por la luz UV y visible.

El α -, β -, γ - y δ -tococerol son antioxidantes naturales monofenólicos presentes en aceites comestibles. Se ha informado una variedad de productos de oxidación química de ellos, tales productos son sus dímeros y trimeros.

Los mecanismos de formación de dímeros involucran la formación inicial de radicales fenoxilo, los cuales reaccionan de dos diferentes maneras:

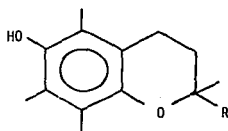
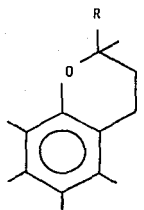
- 1) dos radicales fenoxilo unidos a través de oxígeno o de posiciones orto en el anillo, (fig. 2.2);
- 2) radicales fenoxilo transpuestos a radicales benzoilo seguidos del acoplamiento. Se nota una fuerte preferencia para la reacción relacionada en posición 5 contra la posición 7, si los sustituyentes en estas posiciones son hidrógenos o metilos.

Los factores electrónicos o estéricos señalan esta preferencia que no es fácilmente aparente.

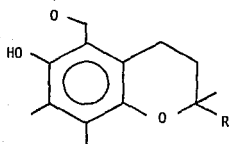
Para prevenir completamente la descomposición del tocoferol presente en el aceite de olivo, sometido a un calentamiento de 180°C durante 10 horas, se le adicionó ácido gálico o ácido tioldipropiónico a una concentración de 0.03%, pero después de 30 y 50 h de calentamiento sólo quedaba del tocoferol original el 46 y 16% respectivamente (38).

En otro estudio se observó que el aceite de palma o de senegal en forma normal e hidrogenado, tuvieron a 180°C una degradación térmica semejante de tocoferoles. En cambio, en el aceite de colza la degradación térmica fue mayor en el aceite hidrogenado que en el no hidrogenado.

En ese mismo estudio se encontró que para prevenir la

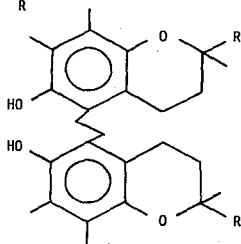


α -Tocopherol



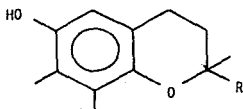
(c1)

5-formil- γ -tocopherol-en

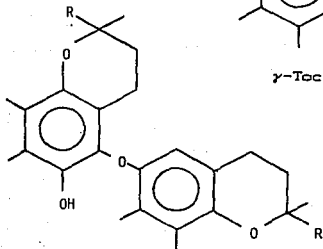


(c2)

1,2-bis(γ -tocopherol-5-yl)etano

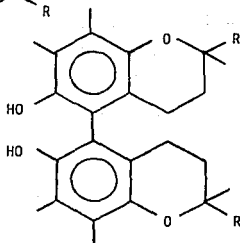


γ -Tocopherol



(c3)

5-(γ -tocopherol-1)- γ -tocopherol



(c4)

5-(γ -tocopherol-5-yl)- γ -tocopherol

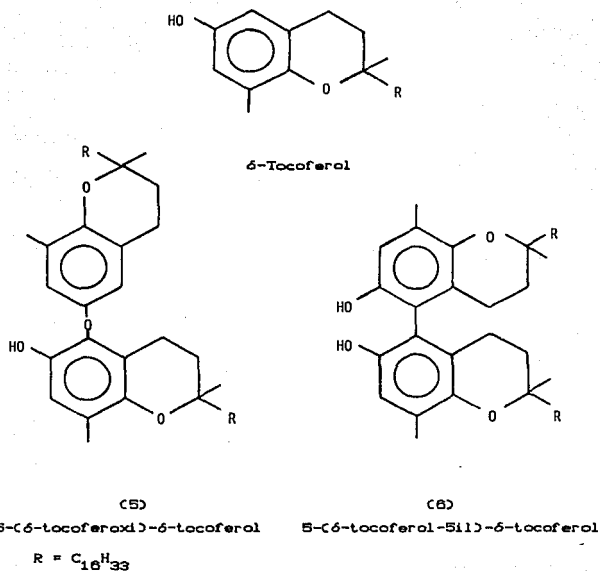


Fig 2.2 Dimeros producto de descomposición de tocoferoles durante el curso de la oxidación de grasas y aceites. Los dimeros tipo éter bifenilico (3) y (5) se producen preferentemente en la oxidación de γ - y δ -tocoferoles, son más estables que los tocoferoles de los cuales provienen y contribuyen como antioxidantes.

descomposición térmica del tocoferol en el aceite de senegal con y sin hidrogenar se les adicionó ácido gálico y ácido tioldipropiónico. En el aceite de colza fueron efectivos los dos compuestos anteriores, y la lecitina (39).

El aceite de girasol obtenido de las semillas de la planta contiene aproximadamente 85% de ácidos grasos insaturados. Es muy predispuesto a la oxidación, pero tiene muy poco ácido linoleico en su composición y no es susceptible a la reversión del sabor (8).

Mediante el desarrollo de ecuaciones basadas en parámetros de la cinética de oxidación, se determinó la inactivación de antioxidantes naturales (tocoferoles) presentes en el aceite de girasol refinado y aceites de girasol y maíz desodorizado. Tales parámetros fueron 1.7, 2.5 y 4.0 años respectivamente a 298 °K. (40).

En un estudio se investigaron los efectos que presentan la xilosa y la glucosa en la degradación del δ -tocoferol presente en el pan. La estabilidad se evaluó por los cambios en el valor de peróxido de la fracción lipídica después de horneado y almacenado a 40 °C

Se encontró que sólo la xilosa inhibe ligeramente la pérdida del δ -tocoferol durante el almacenamiento del pan. También la xilosa acentúa el oscurecimiento y disminuye los aminoácidos libres, en cambio, la glucosa lo hace en muy poca proporción (41).

Durante la preparación de los alimentos pueden ocurrir pérdidas significativas de tocoferoles y tocotrienoles. Por ejemplo, en las harinas suceden reacciones degradativas durante

su almacenamiento o cuando el tiempo de preparación de la masa es prolongado.

Durante el horneado del pan de trigo se destruye alrededor del 25% del α -tocoferol y α -tocotrienol, así como cerca del 12% de β -tocoferol y β -tocotrienol. En general, los métodos de horneado tradicionales destruyen cerca del 50% del α -tocoferol en el pan de centeno (42).

3. FORMULACIONES Y USOS

3.1 Formulaciones (1,2)

Los antioxidantes son ampliamente usados en la industria alimentaria. Las formulaciones que los contienen ofrecen ventajas en sus propiedades y procesos de manufactura. La mayoría de las formulaciones generalmente contienen uno o más de los antioxidantes principales, junto con un sinergista disuelto en un disolvente grado alimenticio. Estos disolventes incluyen aceites vegetales, propilenglicol, monooleato de glicerilo, etanol y monoacilglicéridos acetilados. También se usan combinaciones de disolventes para mejorar la solubilidad y dispersabilidad de los antioxidantes.

Las formulaciones de antioxidantes en productos alimenticios tienen las siguientes funciones:

- 1) proporcionar facilidad de uso y manejo,
- 2) mejorar la exactitud de la aplicación,
- 3) permitir la combinación de antioxidantes y sinergistas en un producto,
- 4) mejorar la solubilidad y dispersabilidad de los antioxidantes,
- 5) minimizar las tendencias de decoloración de los antioxidantes,
- 6) proporcionar combinaciones sinérgicas de antioxidantes.

La adecuada incorporación de antioxidantes requiere de las siguientes consideraciones:

1. Asegurarse que el antioxidante esté totalmente disuelto y

homogéneamente disperso en el producto final. Las fallas en este aspecto son el error más común en el uso de antioxidantes.

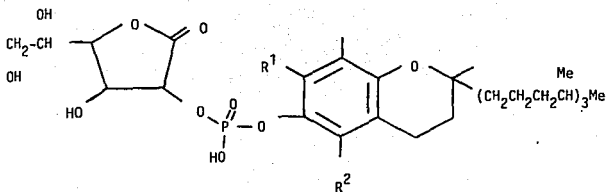
2. Adicionar el antioxidante en el momento adecuado.
3. Tener precaución que en las etapas del proceso no se eliminen o destruyan a los antioxidantes.
4. Adicionar la cantidad permitida del antioxidante.

3.2 Uso en alimentos, fármacos y cosméticos.

Una formulación propuesta para uso general en alimentos, está hecha a partir de vitamina E natural a una concentración del 20%, triglicéridos con ácidos grasos de cadena recta de C_{8-12} 20% , 1-0.2% de decaglicina como emulsificante, 5% de ácido cítrico y 53% de bases (H_2O , alcohol de caña, polialcoholes, azúcares, etc), pH 1.8, o ajustarlo a un valor menor de 3 con ácidos orgánicos o inorgánicos. Esta preparación fue estable a $37^{\circ}C$ por un poco más de 3 meses y fácilmente dispersable (43).

Otra formulación informada para uso en alimentos, productos farmacéuticos y cosméticos, parte de los diésteres de acorbil fosfato tocoferil. En su estructura general ilustrada R^1 y R^2 pueden ser:

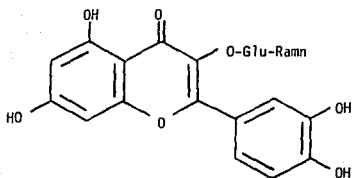
	R^1	R^2
1)	CH_3	CH_3
2)	H	CH_3
3)	CH_3	H
4)	H	H



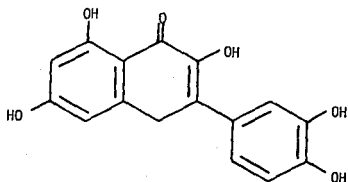
La emulsión se prepara a partir de 2,5% de ácido esteárico, 1,5% de alcohol cetílico, 5,0% de vaselina, 10,0% de parafina líquida, 2,0% de monooleato de polioxietileno, 3,0% de propilenglicol, 1,0% de trietanolamina, 5,0% de ácido ascórbico, 0,1% del derivado diéster, lo necesario de agua para completar el 100% en peso, con saborizante y conservadores (q.s) (44).

Para la conservación de alimentos y cosméticos se describe una formulación que comprende "gambir" como principal componente y tocoferoles a una concentración igual o mayor al 10% en peso del gambir. Se hizo una prueba con 50g de aceite para ensalada y 5.0 g de gambir con 0.3 g de δ -tocoferol, ésta se sometió a un calentamiento de 180°C durante 60 min con aereación. Se obtuvo un valor de 13.2-15.5 nmol de peróxidos/ml comparado con 37.5 - 73.5 nmol de peróxidos/ml sin la adición de gambir y δ -tocoferol (45).

El gambir es el residuo seco del extracto acuoso de las hojas y tallos de la Uncaria y de la Ourouparia gambier, rubiaceas del sudeste de Asia, cuyos constituyentes principales son: el ácido catecutánico, catecol y quercitina.



Vitamina P
(Rutina)



Quercitina

Otra formulación antioxidante para alimentos incluye 1-50% tocoferol, 1-90% de azúcar, 0.1-30% de emulsificante y 1-10% en peso de etanol. Esta formulación se homogenizó y se almacenó a 60°C durante 10 días, sin cambios en su solubilidad y fluidez (48).

Una formulación para alimentos y comida, hecha a base de extracto de caña, se preparó al triturar 10 g de la cubierta de caña, enseguida el polvo se humedeció en éter durante la noche, se evaporó este disolvente y se obtuvieron 0.3 g de dicho

extracto. La composición de la formulación es: 0.1-50% de extracto de café, 1-20% de tocoferol y 1-50% en peso de lecitina (49).

Una formulación para alimentos acuosos contiene como principales ingredientes de 1-60% ó 99-40% en peso tocoferol y 5-60% de solución acuosa de almidón. Específicamente la formulación contiene 3.15 Kg de agua, 1.35 Kg de APDEX (alto contenido de dextrinas ramificadas 10% ciclodextrina) y 0.5 Kg de tocoferol natural (caliente a una temperatura de 50-70°C). La mezcla se homogeneizó y se secó para obtener un polvo. Este aditivo fue estable durante un mes a una temperatura de 20°C y humedad relativa de 81% (50).

Otra formulación incluye una mezcla de tocoferoles, obtenidos a partir de la destilación al vacío de los aceites de las semillas de colza, girasol y soya. Este aditivo contiene 19-36% de α -tocoferol, 4-28% de una mezcla de β - y γ -tocoferol, 1.5-13% δ -tocoferol, 9-13% de fitoesteres y 4-6% de ácidos grasos libres (51).

Es posible solubilizar aditivos a base de tocoferol al ligarlos con aductos de ciclodextrina. Esto se logró disolviendo 0.2 partes de α -tocoferol en 100 partes de éter etílico, esta solución se pasó a través de una columna con 10 partes de aducto de β -ciclodextrina. El aducto se secó al vacío y luego se disolvió en 1000 partes de agua, enseguida se centrifugó para obtener finalmente al antioxidante ya soluble en el líquido sobrenadante.

Para comprobar su actividad se adicionó una solución de azul de metileno (5 mg/ 100 ml de agua) a 2.5 ml de la solución

antioxidante, se leyó la absorbancia de la mezcla a una longitud de onda de 660 nm, las lecturas fueron: 0.65 y 0.63 después de 0 y 45 min de irradiación UV respectivamente; contra 0.65 y 0.46 sin el aducto (52). Otros estudios comprenden la formación de un compuesto de inclusión a partir de 1 parte de β -ciclodextrina y 1 parte de α -tocoferol en sulfóxido de dimetilo, mismo que al ponerlo en solución acuosa de azul de metileno mostró una velocidad de decoloración de 8×10^{-3} /min contra 1.4×10^{-3} /min sin antioxidante (53).

3.3 Saborizantes.

Muchos saborizantes son compuestos muy sensibles a la oxidación. Los productos de oxidación pueden iniciar la descomposición de otros componentes de los alimentos. Por ejemplo, el aceite de naranja en bebidas sabor naranja tiene que protegerse adecuadamente para evitar la descomposición de los carotenoides, los cuales dan el color amarillo-naranja al producto.

Para estabilizar el aceite esencial de limón se utilizó tocoferol como antioxidante a una concentración de 0.01 a 0.05%, obteniéndose resultados similares al ascorbato de estearilo a las mismas concentraciones (54).

3.4 Productos cárnicos.

En productos cárnicos con una larga vida de anaquel, la rancidez puede llegar a ser un verdadero problema. Un ejemplo es el salami, el cual es muy susceptible a la rancidez.

especialmente después de cortarse y empaquetarse. El γ -tocoferol adicionado a este producto no mejora la estabilidad del color pero retarda la oxidación de la grasa e inhibe la formación de sabores rancios.

La adición de tocoferol como antioxidante a una masa de carne picada con sal, presentó buen sabor al asarse después de haber sido almacenada durante tres meses a 20°C (52).

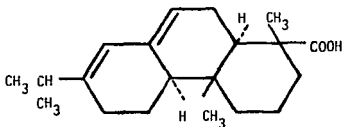
3.5 Confitería.

Los productos de confitería usan antioxidantes para:

- protección de la fase grasosa (grasa, emulsificantes, carotenoides, etc.). Se usan para este propósito tocoferoles y palmitato de ascorbilo o mezclas sinérgicas incluyendo lecitina o ácido cítrico.
- En dulces duros o productos con baja cantidad de lípidos, se puede incluir ácido ascórbico y ácido cítrico para proteger a los carotenoides usados con el propósito de colorear.
- En gomas masticables se pueden usar tocoferoles para evitar el sabor amargo resultante de la oxidación del ácido abiético. La goma masticable está compuesta de una base de goma insoluble en agua y de componentes solubles en agua tales como azúcar, ácidos, etc. Dos componentes tienen que protegerse contra la oxidación: el sabor/componentes de aroma y las gomas tipo éster, las cuales dan elasticidad y plasticidad a la base de goma.

Los ésteres de goma son gliceril ésteres de ácidos resinicos y 90% ésteres glicéridos del ácido abiético. La colofonia

Crosina) es la materia prima básica para la manufactura de los ésteres de goma. En general los productos de descomposición del ácido abiético son amargos.



Acido abiético

La grasa usada en confitería puede almacenarse a 45°C durante un mes sin perder su calidad al adicionarle ácido ascórbico y tocoferol. Se comprobó que estos compuestos fueron capaces de prevenir la pérdida de ácidos grasos insaturados (56). Sin embargo el ácido ascórbico y sus derivados son menos adecuados como antioxidantes en gomas masticables por las siguientes razones:

- el ácido ascórbico puede provocar reacciones de oscurecimiento.
- los ascorbatos de sodio y de calcio son inestables en las gomas masticables.

3.8 Pescado y productos derivados.

El pescado y productos derivados sufren descomposición por varios procesos de oxidación. La oxidación de los lípidos se realiza por el mecanismo de radicales libres. La rancidez puede promoverse por la oxidación enzimática, por

ejemplo en pescado congelado. En otros productos, tales como pescado sin congelar, la decoloración enzimática se debe a la oxidación de compuestos fenólicos. Otra fuente de decoloración es la oxidación del pigmento.

Para conservar pescado seco se empleó un aditivo a base de tocoferoles y ésteres grasos de sacarosa. Se mezclaron 40 g de tocoferol con 50 g de éster graso de sacarosa (densidad 1.146) y 10 g de éster graso de glicerina, para formar el antioxidante. El pescado fue hervido en solución de NaCl junto con el antioxidante. Después se secó y se estudió el efecto conservador del aditivo, cuyos resultados mostraron un mayor tiempo de almacenamiento sin pérdida de sus características (57).

Para la conservación de sardinas se usó una emulsión de aceite en agua con un contenido de 1-80% en peso de tocoferol y 0.1-25 % de un agente emulsificante que se obtiene de una solución acuosa de proteínas con ésteres ácidos de sacarosa. Esta formulación antioxidante se adhiere a la superficie del pescado mejor que las emulsiones convencionales. Un compuesto comercial cuya composición es similar a lo antes señalado (5.0% de tocoferol, 0.5% de leche descremada y 94.5% de agua), retarda muy bien el oscurecimiento en la superficie de la sardina (58).

Para controlar la oxidación de alimentos marinos se empleó una emulsión antioxidante formulada a partir de tocoferol, fitina y gomas naturales como estabilizadores de emulsiones. Específicamente se utilizó tocoferol natural emulsificado en una solución conteniendo ácido fítico, goma de

tragacanto, ácido gálico y ácido ascórbico. Esta emulsión fue estable a 80°C, además controla la decoloración oxidativa del sorgo (59).

3.7 Aceites y grasas, comestibles y para freir.

Las concentraciones de los componentes de agentes antioxidantes líquidos, usados en aceites y grasas comestibles, así como aceites usados para freir pescado, caen normalmente en los intervalos: 1-40% de tocoferol, 0.1-10% de ácido gálico, 0.1-5% de ácido L-ascórbico o su sal o éster, 20-95% de agua, 0.1-5% de glicerol esteres de ácido graso, 0.01-5% de gomas y 0.1-5% vitamina P (46,47).

Por ejemplo: 40% de tocoferol natural (pureza 40%), 2% de ácido succínico monoglicérido, 2% ácido ascórbico, 1% de ácido gálico, 0.2% de quercitina, 0.05% goma de carrobo, 54.75% agua y vitamina P (46,47).

Para prevenir la decoloración de papas peladas, éstas se trataron con una emulsión que contiene 0.001-10% de tocoferoles, 0.0001-5 % de ácido gálico y 0.001-10% de ácido L-ascórbico o algún derivado. Después se picaron en cubo y se sumergieron en la emulsión durante 5 minutos. Enseguida se secaron y fueron mantenidas a 2°C en aire. Las papas bajo estudio no mostraron decoloración después de 3 días, mientras que las que no fueron sometidas a este tratamiento presentaron decoloración después del primer día además de no estar sanas para el consumo (60).

Al comparar algunas propiedades de los tocoferoles con otros antioxidantes de grasas y aceites usados para freir, se encontró que a altas temperaturas los tocoferoles no son volátiles, como lo son el butilhidroxianisol (BHA) y el butilhidroxitolueno (BHT); no causan deterioro del sabor como la *ter*-butilhidroquinona (TBHQ), ni decoloración como la lecitina. Los tocoferoles se pueden usar de cualquier forma para estabilizar las grasas de freir, dado que a 180°C la estabilidad que presentan es relativamente buena y depende de la clase de grasa donde se aplique (51).

4. METODOS ANALITICOS

4.1 Técnica de separación.

Los tocoferoles presentes en los alimentos pueden existir en forma libre o esterificada. Por ejemplo en los aceites de semilla se encuentran principalmente en estado libre. Como ya se ha mencionado, las nueces, semillas, algunos granos y aceites vegetales son buenas fuentes de antioxidantes naturales.

Se conocen diversos métodos para el análisis de los tocoferoles (vitamina E) en productos alimenticios. La figura 4.1 muestra un esquema general analítico para la determinación de tocoferoles en aceites y alimentos. En general las técnicas para la cuantificación de tocoferoles se clasifican como:

- espectrofotométricos / colorimétricos,
- electroquímicos (polarográficos / voltamétricos),
- cromatográficos.

Para la aplicación de cualquier técnica de cuantificación de tocoferoles en alimentos es necesario primeramente su extracción o separación. En la fig. 4.2 se describe la metodología indicada en el "Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists" (AOAC).

4.2 Métodos colorimétricos

Estos métodos determinan el total de tocoferoles. El procedimiento clásico se reportó aproximadamente hace 50 años. Este método se basa en la reacción de color entre el reactivo 2,2-bifuridil y Fe^{2+} , el cual resulta a partir de la oxidación

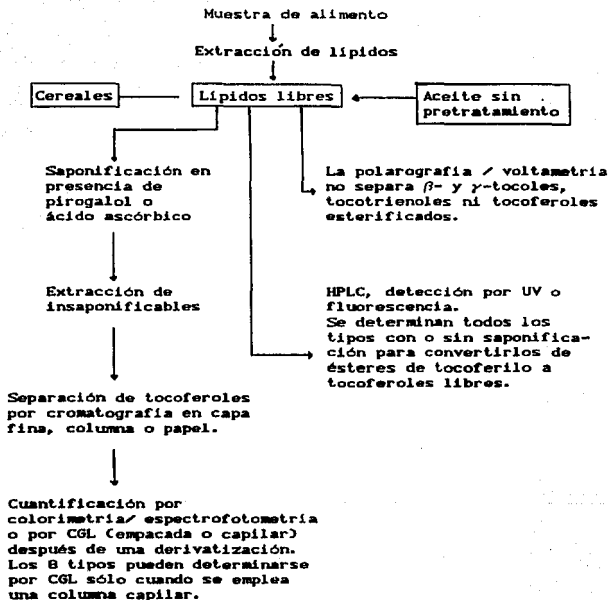


Fig. 4.1 Metodología analítica general para la determinación de tocoferoles.

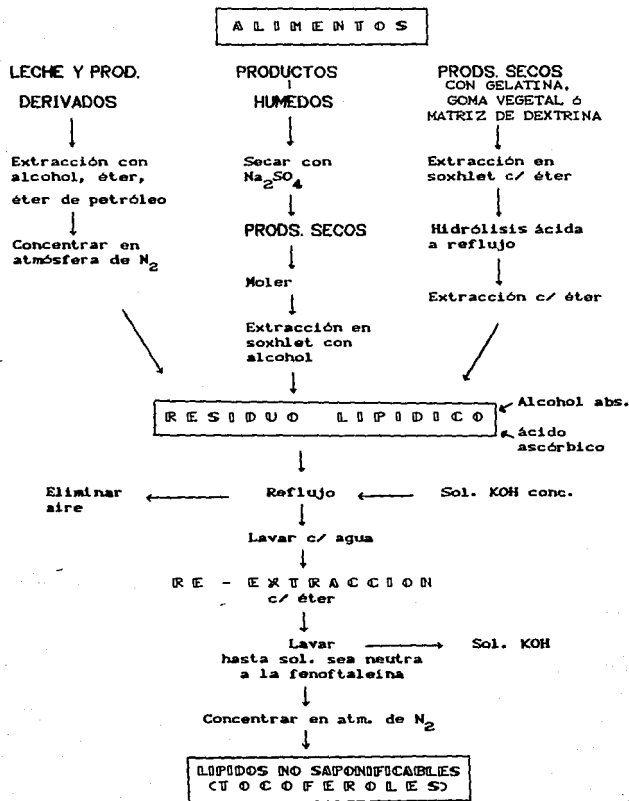


Fig. 4.2 Preparación y saponificación de muestra. (AOAC)
Extracción de d- α -tocoferol, α -tocoferol total y sus acetatos

total de los tocoferoles con FeCl_3 . Años más tarde se modificó este procedimiento para la cuantificación de los tocoferoles totales en mezclas que contienen δ -tocopherol.

Como método oficial para cuantificar α -tocopherol el AOAC señala que después de la separación de los tocoferoles por cromatografía en capa fina, se hacen reaccionar con las soluciones de ortofenantrolina y FeCl_3 , segundos después se adiciona una solución de H_3PO_4 y se agita. La solución colorida resultante se puede centrifugar para sedimentar las partículas absorbentes. Se mide la absorción de la solución sobrenadante en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 534 nm. La cantidad de tocoferol se determina por interpolación en una curva de calibración (62).

Las dificultades encontradas son las diferentes velocidades de reactividad de los diferentes tocoferoles, la desventaja de los procedimientos clásicos es que sólo se mide el contenido total de tocoferoles. Sin embargo es importante medir la concentración de las diversas formas de tocoferoles para calcular la potencia biológica de la vitamina E en los alimentos y para comprender su efecto antioxidante en la estabilidad de los aceites.

4.3 Métodos electroquímicos

Las técnicas voltamétricas y polarográficas se aplican exitosamente en la medición de tocoferoles individuales. Los primeros procedimientos para la determinación de varios tocoferoles emplearon la reducción electroquímica de tocoferilquinonas en el electrodo de gota de mercurio. Después

de saponificar la muestra y extraer con éter el material insaponificable, los tocoferoles se oxidan con Ce^{IV} para formar tocoferilquinonas, requeridas para la reducción polarográfica. Años más tarde, los métodos polarográficos involucraron la oxidación directa de los tocoferoles por medio de diferentes electrodos de carbono.

Los métodos recientes son rápidos, directos y adecuados en la determinación de los principales tocoferoles (α , γ y δ) para propósitos de control de calidad, por ejemplo, en el monitoreo de la pérdida de tocoferoles durante el procesamiento de las grasas o en el control de calidad de alimentos enriquecidos con vitamina E.

Se describe un método electroquímico mejorado para determinar tocoferoles en aceites, grasas y alimentos que contienen grasas. La aplicación de un método electroquímico de micro flujo a través del detector ha reducido el límite de detección a 0.01 mg (para α , γ y δ -tocopherol) por kg de grasa. La reproducibilidad del método es \pm 5% al nivel de tocoferol de 0.1 - 600 mg/kg (53).

4.4 Método polarimétrico

Para la cuantificación del d - ó dl - α -tocopherol por polarimetría el AOAC especifica medir la rotación óptica de la muestra purificada por cromatografía en columna, antes y después de la oxidación. La oxidación es llevada a cabo por la solución de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CND})_6$. A la muestra oxidada se hacen una serie de lavados y se concentra en atmósfera de N_2 para evitar degradación. Por último se mide la rotación óptica para después calcular la

rotación específica como se indica en la referencia (82).

4.5 Análisis cromatográficos.

Las técnicas cromatográficas tales como cromatografía en capa fina, cromatografía gas-líquido y cromatografía de alta resolución (HPLC) se han usado ampliamente para la cuantificación de tocoferoles individuales en aceites y en una variedad de alimentos.

La metodología de cromatografía en capa fina se emplea en forma rutinaria, ya que está al alcance de muchos laboratorios y puede usarse para la separación de tocoferoles y tocotrienoles.

El método de la "Official International Union of Pure and Applied Chemistry" (IUPAC) se basa en la saponificación del aceite con álcali, la extracción del material insaponificable en presencia de pirogalol para prevenir la oxidación de los tocoferoles, enseguida la separación por cromatografía en capa fina y después la cuantificación de los tocoferoles espectrofotométricamente.

El método anterior también se puede usar para la determinación de dímeros de tocoferol, pero no discrimina entre tocoferoles y tocotrienoles, aunque tampoco se separan los β - y γ -tocoles, ya que la etapa de saponificación convierte al tocoferil acetato en tocoferoles libres, por consiguiente este procedimiento cuantifica el tocoferol combinado y libre en conjunto.

Por ejemplo, se ha detectado tocoferol a través de la

cromatografía en capa fina en la mantequilla de cacahuete, salami, salchicha "wiener", trozos de papas, entre otros. Mismo que se ha verificado por HPLC (84).

El método de cromatografía en capa fina establecido por el AOAC para la separación de α -tocoferol permite la selección de los sistemas de solventes de elución. La muestra se aplica en una hoja de alúmina empleando una micropipeta. La cromatoplaca se desarrolla en dos dimensiones usando dos cámaras con solventes de elución diferentes. Se seca la cromatoplaca con N_2 y se rocía con solución alcohólica de diclorofluoresceína. Una vez seca la placa se localizan las manchas de tocoferol bajo la luz UV sin exceder la exposición a la luz UV, ya que se puede destruir al tocoferol (82).

La cromatografía gas-líquido (GLC) también se emplea regularmente para la cuantificación de tocoferoles después de una separación preliminar y limpieza de las muestras por cromatografía en capa fina. El método oficial del AOAC lo aplica a preparaciones farmacéuticas que contienen vitamina E tales como: tabletas, cápsulas, inyectables y líquidos, así como otras formulaciones.

En un procedimiento por cromatografía gas-líquido para la cuantificación del contenido de la vitamina E en aceites vegetales y aceites extraídos de alimentos tipo bocadillos, la vitamina E se determina por saponificación del aceite, extracción con éter de la mezcla saponificada, secado y evaporación del extracto, seguido de esterificación y determinación de los ésteres butirato usando un cromatógrafo de gases equipado con un detector F10 y una columna de vidrio

(1.83m de longitud y 5 mm de diámetro interno) empacada con 3% de SE-30 en gas Chrom. Q, malla 100-120. El límite de detección de α -tocoferol es alrededor de 5 mg/Kg de aceite, sin separación de β - y γ -tocoferol. Se detectó una cantidad considerable de tocotrienoles en el aceite de palma y sus fracciones (65).

La mayoría de los procedimientos empleados en la cromatografía gas-líquido y en capa fina, así como los métodos colorimétricos requieren de largos períodos de análisis desde la preparación de la muestra y/o derivatización de los tocoferoles, previos a su estimación. Ya que los tocoferoles son sensibles a la luz y propensos a la oxidación, pueden ocurrir algunas pérdidas debido a la degradación oxidativa durante el tratamiento de la muestra. Además, los métodos requieren saponificación, los cuales impiden la posibilidad de determinar la proporción relativa de tocoferoles presentes en forma de ésteres. Estas limitaciones y dificultades de los procedimientos analíticos mencionados señalan el desarrollo de un método de cromatografía de líquidos, razón por la cual esta técnica se usa con mayor frecuencia en la actualidad.

Se han descrito muchos sistemas de HPLC para la determinación de tocoferoles en aceites vegetales empleando una columna de sílice. Una solución de aceite en n-hexano o en la fase móvil se aplica directamente a la columna. La separación cromatográfica se realiza generalmente con una mezcla de dos o tres disolventes como fase móvil, siendo los principales componentes el hexano o el heptano a una velocidad de flujo de 1-2 ml/mín, usando un detector de UV a 280 nm (6) a la

longitud de onda de máxima absorción entre 280 y 297 nm) o por detección de fluorescencia (excitación entre 290 - 296 nm; emisión entre 325 - 340 nm) (66).

Se ha logrado considerable desarrollo de las fases estacionarias, particularmente por la introducción de microparticulas en el empaque de las columnas (generalmente 5 μ m). Esto condujo a mejorar el poder de separación y a reducir el tiempo de análisis a aproximadamente 10 minutos.

La mayoría de los aceites vegetales contienen tocoferoles en la forma inesterificada y pueden inyectarse directamente a la columna sin ningún pretratamiento, aparte de disolver la muestra en la fase móvil o en hexano. Los lípidos que contienen tocoferoles necesitan extraerse de las muestras alimenticias previo a la cromatografía. Un procedimiento de extracción para una gran variedad de muestras alimenticias tales como espinaca, leche, carne de res y productos de cereales, parte de 10 g de muestra homogenizada en isopropanol y acetona, la cual se extrae dos veces con hexano. Los extractos de hexano se lavan dos veces con agua y luego se evaporan bajo presión reducida. La eficiencia del procedimiento de extracción para la vitamina E es mayor del 97% (67).

Los alimentos enriquecidos que contienen acetato o palmitato de tocoferilo se analizan después de una saponificación, ya que los ésteres de tocoferol no son fluorescentes. La etapa de saponificación se emplea también para liberar a la vitamina E cuando la muestra se encuentra en forma encapsulada o cuando contiene leche en polvo homogenizada y secada por aspersión. Los tocoferoles, especialmente los

tocotrienoles son muy sensibles al oxígeno en presencia de álcali y debe tenerse cuidado para evitar su destrucción durante la saponificación.

Los antioxidantes tales como el ácido ascórbico o el pirogalol, se adicionan a la mezcla saponificada, la cual se somete a reflujo suave bajo atmósfera de nitrógeno con luz suave. Los materiales insaponificables pueden extraerse con éter dietílico, éter de petróleo o hexano.

Cuando los disolventes se evaporan completamente, se deben agregar a la fase móvil antioxidantes como el BHT, para proteger a los tocoferoles de la degradación oxidativa, pero el BHT y otros antioxidantes adicionados deberán separarse y ser identificados por el equipo de HPLC (88).

Para el análisis de vitamina E en alimentos se usa una gran variedad de sistemas de HPLC en fase inversa, especialmente cuando se determinan otras vitaminas simultáneamente. Sin embargo se puede señalar que el uso de columna de fase inversa C_{18} y fase móvil metanol:H₂O (98:4 v/v), no separa β - ni γ -tocoferoles usando detector de UV a 292 nm o detector de fluorescencia (excitación a 290nm, emisión a 330 nm). Por lo tanto se emplea un sistema cromatográfico de fase normal cuando se desea la separación de las ocho formas comunes naturales del tocoferol.

Los tocoferoles libres exhiben fuerte fluorescencia y una buena elección para su determinación es con un detector de fluorescencia. Los ésteres de tocoferol no fluorescen efectivamente y debe usarse detector de UV si los ésteres no se saponifican antes de aplicar cromatografía. Por lo tanto los

tocoferoles libres y esterificados se pueden determinar separadamente por el uso simultáneo de detectores de UV y de fluorescencia y comparar los resultados.

En contraste con lo anterior se informa la separación del acetato de tocoferilo a partir de los 8 tocoferoles libres, usando una columna de sílica portisil B con una fase móvil de hexano seco: hexano-saturado con agua: éter dibutilico: 2-propanol (45:45:10:0.5, v/v) y detector de fluorescencia (excitación a 290 nm, emisión a 330 nm). Se ha observado que los tocoferoles fluorescen más fuertemente en disolventes tales como dioxano o éter dietílico y la inclusión de estos disolventes en la fase móvil incrementa la sensibilidad del detector (69).

Al usar una fase móvil al 5% de éter dietílico en hexano, se informa un límite de detección para tocoferoles de 2 mg/kg de lípidos. Recientemente se demostró un método de HPLC para separar α - β - γ - y δ -tocoferoles, los correspondientes tocomonoenoles, tocotrienoles y plastocromanol-8 (un tocol estructuralmente relacionado a γ -tocotrienol); en una columna amino-ciano de 5 micras usando como fase móvil hexano : tetrahidrofurano (94:6, v/v). El límite de detección (señal de ruido en relación de 3) para α -tocoferol usando excitación de fluorescencia a 210 nm fue de 0.5 mg/Kg aceite. Además se descubrió la presencia de α -tocomonoenol (no identificado previamente) en el aceite de palma, a un nivel de 25 mg/Kg (70).

Se han determinado fácil, rápida y confiablemente los tocoferoles del café por HPLC con una columna RP (250 mm X 4.6 mm) con un gradiente de solvente de 97% de metanol acuoso hasta 100% de metanol (7 minutos) y un detector UV-Visible a una longitud de onda de 296 nm. Se obtuvieron resultados reproducibles con un contenido promedio de 12.02 $\mu\text{g/g}$ de café para α - y 41.84 μg β - + γ -tocoferol por gramo de café, en extracciones hechas con etanol. Para extracciones con éter de petróleo los resultados fueron 4.82 y 33.2 $\mu\text{g/g}$ de café para α - y (β + γ)- tocoferol respectivamente. Se encontró además que las cantidades de tocoferoles difieren grandemente entre el café verde y el café tostado en extracciones de éter de petróleo.

Por otro lado, al estudiar los cambios durante la oxidación del aceite de café y al analizar las fracciones aceitosas, se encontró que los tocofeoles no son responsables de la gran resistencia del aceite de café a la oxidación (71).

5. DISCUSION

Unos autores han clasificado a los antioxidantes como primarios y secundarios; otros simplemente como antioxidantes y sinergistas. En general podríamos decir que los antioxidantes primarios ó antioxidantes son los compuestos que actúan con los radicales producidos en la oxidación, como son los peróxidos, hidroperóxidos, etc., en cambio los antioxidantes secundarios o sinergistas reaccionan con el oxígeno ya sea atrapándolo o bien por quelación con iones metálicos como el fierro y cobre y además pueden reaccionar con los antioxidantes primarios para regenerarlos.

Se ha encontrado que al comparar la actividad antioxidante de una mezcla de tocoles, el α -tocoferol es el primero en consumirse, esto probablemente se debe a que los tres grupos metilos presentan efecto inductivo en el anillo aromático, lo cual no le permite formar el híbrido de resonancia, sino que incrementa la reactividad del grupo hidroxilo del α -tocoferol.

Es frecuente encontrar una mayor actividad antioxidante cuando se usa una mezcla de tocoferoles que al usarse cada tocoferol por separado. Dado que al terminarse el poder antioxidante de un análogo continúa otro y al final puede decirse que se presenta un efecto aditivo, pero si se usa sólo un tipo de tocoferol, únicamente se registrará la actividad antioxidante de ese análogo de tocoferol.

Los tocoferoles de mayor actividad antioxidante informados en la mayoría de los casos son: δ - y γ -tocoferol.

Esto se debe tal vez a que sus principales productos de oxidación (degradación) presentan una elevada estabilidad y actividad antioxidante. Los compuestos a los que se refieren son el δ -tocoferol-eter-dimero y el γ -tocoferol-eter-dimero respectivamente. Su estabilidad se puede deber a la forma éter que presentan, ya que ello le confiere un mejor arreglo espacial y a la vez le permite una mejor interacción del grupo hidoxilo con los radicales libres, que es el responsables de que aún presenten actividad antioxidante.

Existen otros factores que determinan la efectividad de los antioxidantes, tales son: tipo de sustrato, condiciones de temperatura, presencia de oxígeno o iniciadores de radicales, tiempo de exposición a éstos y tipo de alimento, por lo tanto es importante conocer éstos y otros factores para hacer un adecuado uso de los tocoferoles como antioxidantes.

Al comparar la actividad antioxidante de los tocoferoles con otros antioxidantes en diversos sustratos tales como aceites de aguacate, soya, de palma y grasa para confitería, en todas las pruebas se describió la actividad antioxidante como menor, inefectiva o relativamente pobre, para cada una de las condiciones de tiempo y temperatura a las que se sometió.

En el caso del aceite de aguacate sometido a un almacenamiento de 80° C en la oscuridad, la pobre actividad antioxidante mostrada por el α -tocoferol y el etoxiquin se debe probablemente a una baja reactividad con los componentes grasos del aceite, en cambio, el galato de propilo presenta mayor actividad antioxidante tal vez, por su anillo polihidroxilado, lo que le permite reaccionar con un número mayor de radicales,

y a la vez, le confiere una mayor estabilidad.

En este tipo de estudio, donde se compara la actividad antioxidante del tocoferol con otros compuestos llama la atención que la caseína se utilice a una concentración de 10.05%, en comparación al tocoferol a 0.01%; esto presupone una menor actividad antioxidante del primer compuesto en productos de confitería. Aunado a esto, su costo relativo es probable que limite su uso a productos caros de confitería lácteos.

Para retardar la oxidación de grasas, aceites o alimentos con elevado contenido de ácidos grasos se utilizan ampliamente mezclas de compuestos, dado que se ha observado que presentan una mayor actividad que si se usara un solo compuesto o antioxidante.

El ácido ascórbico puede actuar a diferentes niveles, uno es mediante la reacción con el radical tocoferilo para regenerar al antioxidante tocoferol y la otra forma es cuando reacciona con el oxígeno presente para formar el ácido deshidroascórbico (forma oxidada). Esta última manera de actuar dió origen a que se le nombre como agente atrapador de oxígeno. Por ello se ha usado frecuentemente junto con tocoferoles para inhibir o retardar la oxidación de diversos alimentos.

También se han usado formulaciones que incluyen a tocoferoles y al ácido cítrico. Los ésteres del ácido cítrico no se han empleado porque presentan bajo nivel desactivador de metales, contrario a lo que muestra la forma ácida. Por ello cabe pensar que los grupos carboxilos libres interactúan con los iones metálicos de manera similar que el ácido

etilendiaminotetracético (EDTA) o agentes secuestrantes de metales.

Las proteínas, péptidos y aminoácidos presentan efecto sinérgico con los tocoferoles dado que los primeros por sus largas cadenas, grupos carboxilo y amino intermedios y terminales, pueden actuar como agentes quelantes.

Uno de los parámetros a vigilar en la adición de antioxidantes es su concentración, que debe ser lo suficiente como para inhibir la oxidación de la grasa, pero no excesiva ya que puede presentarse el efecto pro-oxidante

La actividad pro-oxidante consiste en que el propio antioxidante actúe a favor de la oxidación, esto se produce porque el número de radicales del antioxidante es mayor al del sustrato.

Existen factores que modifican el comportamiento pro-oxidante, tal es el caso del incremento de la temperatura y la presencia de agua, que aceleran este comportamiento. El primero, acelera el movimiento molecular y con ello el choque entre las moléculas reactantes, el agua probablemente sea el vehículo de sustancias iniciadoras de radicales tales como iones u oxígeno disuelto. En cambio la presencia de sinergistas puede reducir la actividad pro-oxidante, que en determinado momento pudiera manifestar el antioxidante, por regeneración del mismo o mediante la quelación de trazas de metales.

La concentración adecuada del antioxidante debe estudiarse en determinadas condiciones de temperatura y tiempo de interacción, así como el tipo de sustrato o alimento donde se aplique porque pueden causar la degradación de los tocoferoles

que se traduce en pérdida de actividad antioxidante o protección del alimento.

La degradación de los tocoferoles produce una serie de compuestos que pueden presentar en determinados casos, cierta actividad antioxidante. Para prevenir la degradación de los tocoferoles naturales se hace necesario el uso de otros compuestos antioxidantes, por ejemplo los ácidos gálico y tioldipropiónico, entre otros, que se oxidan en lugar de los tocoferoles.

Debe de tomarse en cuenta que los componentes del alimento interactúan con los tocoferoles, por ejemplo: la xilosa inhibe ligeramente la pérdida del δ -tocopherol del pan, tal vez por su carácter reductor, pero es menos reactivo que el grupo hidroxilo del tocoferol.

Se encontró que los tocoferoles pueden destruirse durante los tratamientos térmicos comunes que sufren los alimentos tales como el horneado, calentamiento de los aceites usados para freír, por lo que es importante tener en cuenta el tipo de procesamiento que va a sufrir el alimento al cual se le adicionaron tocoferoles.

El tocoferol se usa junto con sinergistas como los ácidos cítrico y ascórbico y otras sustancias como el gambir extracto que comprende entre otras sustancias, al catecol, catecol rojo y quercitina, por lo que podría decirse que es un concentrado de antioxidantes polihidroxilados, que ayudan a evitar la oxidación de los alimentos.

La mayoría de las formulaciones revisadas hacen uso de emulsificantes, que ayudan a la incorporación del tocoferol y

estabilizan las emulsiones, dado que reducen la tensión superficial entre la fase hidrófoba e hidrofílica. Los emulsificantes más frecuentemente usados son los ácidos grasos libres (ácido esteárico), acilglicéridos, propilenglicol, algunas gomas, polisacáridos y lecitina.

El tocoferol es una opción para evitar la oxidación del ácido abiético que produce sabor amargo. Esta nota amarga se debe a la polimerización del ácido abiético, puesto que es una sustancia policíclica cuya parte susceptible a la oxidación son los dos dobles enlaces presentes en dos anillos de la molécula.

El tocoferol además de prevenir la oxidación de ácidos grasos, estabiliza sustancias terpénicas, tal es el caso del limoneno y del β -caroteno. Estos son responsables del sabor a limón y del color amarillo-naranja, respectivamente. El primero es un monoterpeno (2 unidades isoprénicas) y el segundo es un tetraterpeno (4 unidades isoprénicas).

La aplicación de los tocoferoles junto con sustancias sinérgicas y otros antioxidantes, previene en buena medida la oxidación de diversas sustancias, por lo cual forman parte de formulaciones que se emplean en aceites comestibles y esenciales, en la carne, pescado, sardina y en general alimentos marinos, granos y productos derivados de estos como harinas, panes y galletas.

El AOAC utiliza la cromatografía en capa fina como método oficial de separación de tocoferoles, previa extracción y saponificación de la muestra de alimento, dado que los tocoferoles forman parte del material lipídico insaponificable. Como en la etapa de saponificación se rompe el

C-O de los ésteres de tocoferilo, se deben determinar: el tocoferol total proveniente de la forma éster, el suplementado y el tocoferol natural.

La cromatografía en capa fina no separa las diversas formas del tocoferol, cuyo contenido se cuantifica por colorimetría, oxidación-polarografía ó por cromatografía oxidativa. El contenido se reporta en la forma α -, pero dependiendo del objetivo de la cuantificación, se especifica el tipo de tocoferol (natural, suplementado o total).

Una metodología que no está comprendida como oficial pero que se usa actualmente con gran éxito, es la cromatografía de líquidos de alta resolución que reduce el tiempo de preparación de las muestra y aumenta la exactitud en la cuantificación de tocoferoles, no sólo del tocoferol total sino de cada uno de los derivados tocoles y tocotrienoles.

CONCLUSIONES

Los tocoferoles son compuestos que pueden actuar como antioxidantes grado alimenticio.

Inhíben la oxidación de grasas, aceites o cualquier alimento susceptible a este tipo de deterioro.

El nombre genérico tocoferoles engloba los análogos llamados α -, β -, γ - y δ -tocóferoles que presentan una misma estructura general y se diferencian entre otros aspectos por la posición de los grupos metilo.

Los tocoferoles se encuentran principalmente en alimentos con alto contenido lipídico como son aceite y grasas, nueces, semillas oleaginosas y en menor proporción en granos.

El δ - y γ -tocóferol presentan una mayor actividad antioxidante que el resto de los análogos.

La actividad antioxidante que presentan los tocoferoles es baja o pobre cuando se compara con otros antioxidantes de origen sintético.

El uso de tocoferoles junto con otros compuestos sinérgicos tales como ácido cítrico, ácido ascórbico, péptidos y aminoácidos, entre otros, potencia su actividad antioxidante.

Los tocoferoles sometidos a procesos térmicos sufren reacciones degradativas y consecuentemente la pérdida o reducción de su actividad.

El exceso de tocoferoles en una formulación induce la oxidación del alimento por el propio antioxidante o efecto pro-oxidante.

Una formulación adecuada a base de tocoferoles es aquella que cumple con su objetivo de inhibir el deterioro oxidativo del alimento, a la concentración mínima.

El uso y aplicaciones desarrolladas considera diversos aspectos como son: tipo de materia prima, condiciones a las cuales será sometido el alimento, características finales del producto y condiciones de almacenamiento.

La detección y análisis de tocoferoles es fundamental tanto en su control de calidad, como para cuantificar su composición y concentraciones en formulaciones y alimentos.

Los métodos analíticos son la base del control de calidad, del proceso y de la validación en investigación y desarrollo.

Los métodos cromatográficos en capa fina, en columna y gas-líquido, así como los colorimétricos y polarográficos, son oficiales para la cuantificación del α -tocoferol.

Todos los métodos analíticos requieren previamente la extracción y saponificación de la muestra para obtener los lípidos insaponificables.

Los métodos de análisis más modernos confiables y precisos son los cromatográficos instrumentales (CGL y HPLC) con los que se han podido cuantificar las diversas formas de tocoferoles y tocotrienoles presentes en alimentos.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Smith J. Editor.- Food Additive User's Handbook. AVI. Inc. U.S.A. 1991.
- 2) Hudson B. J. F. Editor.- Food Antioxidants. Elsevier Applied Science. London and New York. 1990
- 3) Fennema O. R. Editor.- Food Chemistry. Marcel Dekker, Inc. New York, 1985.
- 4) Bhagavan N. V. Editor. - Bioquímica. Nueva Editorial Interamericana S.A. de C.V. México, 1978.
- 5) Hicks Gómez J. J. y Díaz Zagoya J. C. Editores.- Bioquímica e Inmunología. Tomo 2. Editorial Plenso, S.A. de C.V. México, 1988.
- 6) West S. E. et. al.- Bioquímica Médica. Nueva Editorial Interamericana S.A de C.V. México, 1989.
- 7) Houssay A. B.- Fisiología Humana. "El Ateneo" Pedro García S. A. Argentina, 1978.
- 8) Branen A.L. et. al. Editors.- Food Additives. Marcel Dekker, Inc. New York 1990.
- 9) Syvaöja E. L. et. al.- "Tocopherols and tocotrienols in finnish food: oils and fats" J. Am. Oil Chem. Soc. 63 (3), 328 (1986).
- 10) Gottstein T. et.al.- "Model study of different antioxidant properties of α - and γ -tocopherol in fats" Fett Wiss. Technol. 92 (4), 139 (1990). C.A. 113, 96252j (1990).
- 11) Nikiki E. et.al.- "Oxidation of lipids. XII. Antioxidant activities of α -, β -, γ -, and δ -tocopherols" Bull. Chem. Soc. Jpn. 59 (2), 497 (1986). C.A.

104, 202410k (1986).

- 12) Nishina A. et. al. - "Oxidation prevention of lipids containing highly unsaturated fatty acids using α -tocopherol" Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 63,256,699 [88,256,699] 15 Apr 1987. C.A. 110, 211288c (1989).
- 13) Gapor Ab. et.al. - "Antioxidant activities of palm vitamin E with special reference to tocotrienols" Elaeis 1 (1), 63 (1989). C.A. 112, 156951e (1990).
- 14) Ha K. H. and Igarashi O. - "Dissappearance and interrelation of tocopherol analogs during autoxidation of corn oil and synergistic effect of L-ascorbic acid palmitate with α -tocopherol" Nippon Shokuhin Kagyo Gakkaishi 35 (7), 464 (1988). C.A. 109, 229064r (1988).
- 15) Minoru A. et. al. - "Antioxidant effects of tocopherols on palm oil in frying tests" Nippon Shokuhin Kagyo Gakkaishi 34 (11), 741 (1987). C.A. 108, 73976r (1988).
- 16) Cetin M. - "Changes in the tocopherol and tocotrienol content of soybean and oat oil during the automated determination of oxidation stability by the Rancimate method" Dtsch. Lebensm-Rundsch. 85 (12), 390 (1989). C.A. 112, 117563h (1990).
- 17) Yoshii Y. et. al. - "Effect of tocopherols on flavor preservation in rice crackers" Kenkyu Hokoku Niigata-ken Shokuhin Kenkyusho 26, 35 (1990). C.A. 114, 5088s (1991).

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 18) Aoyama M. et. al. - "Effect of addition of tocopherols on oxidative stability of potato chips" Nippon Shokuhin Kagyo Gakkaishi 33 (8), 407 (1986). C.A. 105, 132378a (1986).
- 19) Werman M.J. and Neeman I. - "Effectiveness of antioxidants in refined bleached avocado oil" J. Am. Oil Chem. Soc. 63 (3), 352 (1986). C.A. 104, 167127z (1986).
- 20) Pazola Z. et. al. - "Effect of some antioxidants on fat stability during deep frying storage of fried potato products" Ernaehrung 11 (8), 546 (1987). C.A. 107, 235094a (1987).
- 21) Ryoji T. - "Palm oil stabilized against heat with mixed antioxidants" Jpn Kokai Tokkyo Koho JO 63 20,395 [88 20,395] 14 Jul 1986. C.A. 110, 153081s (1989).
- 22) Stepanenko T. A., et. al. - "Maintaining the quality of confectionery fats in bulk storage" Khlebopek. Konditer. Prom-st. 1986 (9), 9. C.A. 105, 224847f (1986).
- 23) De Koning A.J. and Shirley M. - "The storage behaviour of a number of fish oil health capsules at ambient temperature" SA J. Food Sci. Nutr. 1(1), 7 (1989). C.A. 112, 117506s (1990).
- 24) Pocker J. E. et. al. Nature 278, (1979) 738.
- 25) Niki E. et. al. Chem. Lett. (1982) 799.
- 26) Niki E. et. al. Biol. Chem. 259 (1984) 4177.
- 27) Nishina A. - "Antioxidant effects of tocopherols and

- L-ascorbic acid on ethyl eicosapentaenoate an methyl linoleate" Agric. Biol. Chem. 8 (6), 1885 (1991). C.A. 115, 113005s (1991).
- 28) Wade V. N. et. al.- "The autoxidative stability of anhydrous milk fat with and without antioxidants" Milchwissenschaft 41 (8), 479 (1986). C.A. 105, 189667y (1986).
- 29) Al-Tahiri R. A. et. al.- "Peroxide production during the storage of anhydrous milk fat with and without antioxidants" Egypt. J. Dairy Sci. 15 (2), 193 (1987). C.A. 109, 5448f (1988).
- 30) Kanemarsu H. Japan Oil Chem. Soc., 32 (1983) 695.
- 31) Aoyama M. et.al.- "Studies of the improvement of tocopherols. XI. Antioxidant efficiencies and effective synergists on margarine" Yukagaku 35 (6), 449 (1986). C.A. 105, 98201b (1986).
- 32) Seher A. and Dagmar L.- "Natural antioxidants V: antioxidants and synergistis of Antarctic krill" Fette, Seifen, Anstrichm. 87 (11), 454 (1985). C.A 104, 33155y (1986).
- 33) Heimann W. et. al. Fette-Seifen-Anstrichmittel, 59 (1957) 330-8.
- 34) Jung M. Y. and Min D.B. - " Effects of α -, γ -, and δ -tocopherols on oxidative stability of soybean oil" J. Food Sci. 55 (5), 1464 (1990). C.A. 115, 7274u (1991).
- 35) Cillar J. et. al.-" α -tocopherol prooxidant effect in aqueous media; increased autoxidation rate of

- linoleic acid" J. Am. Oil Chem. Soc. 57, 252 (1980).
- 36) Cillard J. et. al. - "Effect of experimental factors on the prooxidant behaviour of α -tocopherol" J. Am. Oil Chem. Soc. 57, 255 (1980).
- 37) Cillard, J. and Cillard, P. - "Inhibitors of the prooxidant activity of α -tocopherol" J. Am. Oil Chem. Soc. 63 (9), 1185 (1986). C.A. 105, 224748x (1986).
- 38) Kajimoto G. et. al. - "Preventive countermeasures to the thermal oxidation of tocopherol in oil" Nippon Eiyu, Shokuryo Gakkaishi 39 (5), 397 (1986). C.A. 108, 48855v (1987).
- 39) Kakimoto G. et. al. - "Effects of lecithin, gallic and thiodipropionic acids on the thermal decomposition of tocopherols in heated hardened vegetable oils" Nippon Eiyu, Shokuryo Gakkaishi 40 (4), 321 (1987). C.A. 107, 153086k (1987).
- 40) Vardanyan R. L. et. al. - "Oxidation of vegetable oils" Arm. Khim. Zh. 43 (7), 427 (1990). C.A. 114, 246139h (1991).
- 41) Ochi T. et.al. - "Effects of xylose and glucose on fat stability of cookies" Nippon Shokuhin Kagyo Gakkaishi 37 (11), 849 (1990). C.A. 114, 24618r (1991).
- 42) Piironen V. et. al. - "Stability of tocopherols and tocotrienols in food preparation procedures" J. Food Compos. Anal. 1(1), 53 (1987). C.A. 108, 166223y (1988).

- 43) Kasori A. et.al. - "Antioxidants for food" Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 81 78,368 [86 78,368] 26 Sep 1984. C.A. 105, 96249y (1986).
- 44) Senoo K. et. al. - "Tocopheryl ascorbyl phosphates as antioxidants for pharmaceutical, cosmetics, and foods" Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 83,139,972 [88,139,972] 02 Dec 1986. C.A. 111, 45289t (1989).
- 45) Fukushima M and Kawashima I. - "Antioxidant containing gambir for preservation of food and cosmetics" Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 83,242,689 [89,242,689] 27 Sep 1989. C.A. 112, 137852e (1990).
- 46) Nishina A. et. - "Antioxidizing agents for foods" Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 81,289,835 [86,289,835] 19 Dec 1986. C.A. 107, (1987).
- 47) Pyriadi T. M. and Nazhat N. Y. - "Retardation of rancidity in some edible fats and oils processed in Iraq" Proc.-World Conf. Emerging Technol. Fats Oils Ind. (1985), (1986). C.A. 107, 196675u (1987).
- 48) Nisina A. and Hoyakawa T. - "Soluble tocopherol compositions as antioxidants for foods" Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 02 83,315 [90 83,315] 21 Sep 1988. C.A. 113, 76889u (1990).
- 49) Nisina A. et. al. - "Manufacture of antioxidants for food and feed" Jpn Kokai Tokkyo JP 02,173,183 [90,173,183] 27 Dec 1988. C.A 114, S112v (1991).
- 50) Nakamura T. et.al. - "Stable and antioxidative emulsions containing tocopherol and starch" Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 01,157,369 [89,157,369] 11 Dec

1987. C.A. 112, 34891x (1990).
- 51) Mares E. et.al. - "Tocopherol concentrate as food additive and antioxidant" Czech. CS 240,84425 Jun 1984. C.A. 108, 74036m (1988).
- 52) Enmanji K. and Yamaguchi H. - "Water-soluble antioxidants" Jpn Kokai Tokkyo Koho Jp 61 21,184 [86 21,184] 10 Jul 1984. C.A. 109, 7458a (1986).
- 53) Enmanki K and Yamaguchi H. - "Water- soluble antioxidants" Jpn Kokai Tokkyo Koho JP 6100,288 [86 00,288] 13 Jun 1984. C.A. 104, 225867d (1986).
- 54) Yamaguchi N. and Tomayama R. - "Improvement of the oxidative stability of citrus essential oils" Aichi-ken Shokihin Kogyo Shikensho Nenpo 28, 92 (1987). C.A. 112, 20092r (1990).
- 55) Miyawaki M. et. al. - "Natural antioxidants containing tocopherol for food" Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 63 08,490 [88 08,490] 27 Jun 1986. C.A. 109, 21926r (1988).
- 56) Stepanenko T. A. et. al. - "Fatty acid composition of confectionery fat under conditions of storing temperatures" Izv. Vyssh. Uchebn. Zaved., Pishch. Tekhnol. (4), 45 (1987). C.A. 107, 216375b (1987).
- 57) Umeda H. et. al. - "Antioxidant compositions containing tocopherol and sucrose fatty acid esters for food preservation" Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP -- 62,273,281 [87,273,281] 20 May 1986. C.A. 108, 203562f (1988).

- 58) Nishina A. and Ito M. - "Oil-in-water emulsions containing tocopherol and water-soluble proteins and/or sucrose fatty acid esters as antioxidants for dried sardines" Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 01.137,934 [89.137,934] 19 Nov 1987.
- 59) Nishina A. and Kakizaki M. - "Food antioxidant emulsion" Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 62,111,876 [87,111,876] 12 Nov 1985. C.A. 107, 133022h (1987).
- 60) Nishina A. et. al. - "Discoloration prevention of potatoes by antioxidant mixtures of tocopherols, gallic acid" Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 63,133,939 [88,139,939] 25 Dec 1986. C.A. 109, 189218g (1988).
- 61) Pongracz G. - "Heat stability of the tocopherols" Fett Wiss. Technol. 90 (7), 247 (1988). C.A. 109, 127456c (1988).
- 62) Horwitz W. Editor. - Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Thirteenth Edition 1980. Washington, D.C.
- 63) Ishizahi M. et. al. - J. Food Hyg. Soc. 18, 230 (1975).
- 64) Hayashi M. et. al. - "Determination of antioxidants in fatty foods by TLC and HPLC" Rahuno Kagaku, Shokuhin no kenkyu 36 (2), A77 (1987). C.A. 107, 114416y (1987).
- 65) Leventhal B. et. al. - J. Food Sci. 6, 453 (1978)
- 66) Taga M. et. al. - J. Am. Oil Chem. Soc. 51, 928 (1984).
- 67) Brown W. - "Process for separating tocopherols and sterols from deodorizer sludge and the like" US

[3,153,055] 1984.

- 68) Nissen H. P. - "Separation of preservatives and antioxidants by HPLC" GIT-Suppl. 86 (2), 41 (1986). C.A. 106, 48710r (1987).
- 69) Chang W. et. al. J. Food Sci. 48, 858 (1983).
- 70) Mukai K. et. al. - "Tracking the use of antioxidants through industry surveys" Food Chem. Toxicol. 24 (10-11), 1049 (1986). C.A. 106, 118342Y (1987).
- 71) Cros E. et. al. - "Tocopherols in coffe. Hight-pressure liquid chromatographic determination" Colloq. Sci. Int. Cafe 85C(11), 263 (1985). C.A. 106, 48719a (1987).