



**UCAM**

UNIVERSIDAD CATÓLICA  
DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO  
Programa de Doctorado de Ciencias de la Salud

Uso de extractos de romero y otras fuentes vegetales  
como antioxidantes tecnológicos en aceites  
alimentarios. Estudio comparativo de eficacia frente  
a antioxidantes sintéticos. Relación estructura-  
actividad.

Autor:

María D. Mira Sánchez

Directores:

Dr. D. Julián Castillo Sánchez

Dra. Dña. Juana María Morillas Ruiz

Murcia, Septiembre de 2019





**UCAM**

UNIVERSIDAD CATÓLICA  
DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO  
Programa de Doctorado de Ciencias de la Salud

Uso de extractos de romero y otras fuentes vegetales  
como antioxidantes tecnológicos en aceites  
alimentarios. Estudio comparativo de eficacia frente  
a antioxidantes sintéticos. Relación estructura-  
actividad.

Autor:

María D. Mira Sánchez

Directores:

Dr. D. Julián Castillo Sánchez

Dra. Dña. Juana María Morillas Ruiz

Murcia, Septiembre de 2019





# UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA  
DE MURCIA

## **AUTORIZACIÓN DE LO/S DIRECTOR/ES DE LA TESIS PARA SU PRESENTACIÓN**

El Dr. D. Julián Castillo Sánchez y la Dra. D. Juana María Morillas Ruiz como Directores de la Tesis Doctoral titulada “Uso de extractos de romero y otras fuentes vegetales como antioxidantes tecnológicos en aceites alimentarios. Estudio comparativo de eficacia frente a antioxidantes sintéticos. Relación estructura-actividad.” realizada por Dña. María Dolores Mira Sánchez en el Departamento de Tecnología de la Alimentación y Nutrición, **autoriza su presentación a trámite** dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

**LO QUE FIRMO, PARA DAR CUMPLIMIENTO A LOS REALES DECRETOS 99/2011, 1393/2007, 56/2005 Y 778/98, EN MURCIA A SEPTIEMBRE DE 2019.**



## AGRADECIMIENTOS

Quiero mostrar mi agradecimiento en primer lugar a la Universidad Católica de San Antonio de Murcia por la concesión de la beca de Doctorado Industrial, que me ha permitido realizar el trabajo que aquí se presenta. Aprovecho también para agradecerle a esta Universidad la formación académica y humana que me ha ofrecido durante todos estos años. Gracias a cada uno de los profesores y compañeros que he encontrado en este camino, gracias de corazón, porque siento que esta es mi casa, a la que espero volver siempre.

Gracias a Nutrafur SA-IFF-Frutarom por haber hecho posible la realización de este convenio de Doctorado Industrial. Gracias a Juan Lorente por la confianza depositada en mí y por brindarme generosamente esta oportunidad. Gracias a mis compañeros de Nutrafur, cada uno de vosotros habéis formado parte de este camino. Un gracias muy especial a mi jefe y director, Julián Castillo, por tanto, por todo: por tu buen hacer, por tu ánimo, por tu apoyo, por tu confianza, por tu lucha incansable, por tu mirada apreciativa, por ser el mejor jefe que he tenido y, estoy segura, el mejor que tendré. Un inmenso gracias de corazón.

Gracias a mi directora, Juana María Morillas, por haberme acompañado desde que llegué a esta universidad, por haber puesto color a la temida química y haberla convertido en un reto apasionante, ¡incluso divertido! Gracias por tu cercanía, por los cafés con siempre constructivas conversaciones, por todo lo que hemos compartido durante todos estos años, por lo que me has enseñado y me enseñas cada día a nivel personal y profesional. Has sido la mejor compañera que podía tener en este viaje académico y personal. Te estaré agradecida toda mi vida.

Gracias al Vicerrectorado de Investigación por vuestra disposición y buen hacer siempre. Gracias, Elena, por tu gran ayuda con cada papeleo del doctorado industrial. Gracias de corazón, Silvia Navarro, por tu inmensa ayuda en todo este proceso de tesis, por tu buen hacer e impecable trabajo. Gracias, Estrella Núñez, por tu ayuda, por tu apoyo y tu confianza. Gracias por enseñarme tantísimo y por ser un ejemplo para mí a todos los niveles durante todo este tiempo. Aun recuerdo con inmenso cariño nuestra primera clase de bioquímica juntas. Gracias por esta oportunidad. Un eterno gracias.

Un gracias muy especial a mis compañeros de despacho y laboratorio: Rebeca, Sara, Teresa, Julia, Cristina, Victoria, Jose Antonio, Ramiro, Manu, Jose Manuel. Gracias, Silvia y Estefanía, por responder con cariño a mis numerosas dudas. Gracias, equipo, por todos los ratos buenos y menos buenos compartidos. Habéis sido lo mejor de este tiempo, la mejor compañía, el mejor equipo. Cada uno con vuestros matices particulares, que os hacen únicos, me habéis aportado muchísimo aprendizaje humano y profesional, me lo llevo todo conmigo.

Gracias, Gabi y Jose Manuel, por los ratos de desconexión, risas y “pescadito frito” en los laboratorios. Gracias por vuestra ayuda y disponibilidad, me lo habéis hecho todo más fácil. Gracias, Gema y Vicente, por la revisión de este trabajo. Gracias, David y Carmen, por vuestra amabilidad y ayuda en el procesamiento estadístico de los datos experimentales. Aparecisteis en el momento justo y vuestra ayuda fue vital. Eterna y profundamente agradecida a todos.

Gracias a mi querida y gran familia. Gracias a mis padres por su apoyo durante todos estos años, por su esfuerzo diario para darme siempre la mejor educación académica y, sobre todo, humana. Gracias por enseñarme y orientarme siempre hacia la excelencia profesional y valor humano. Gracias a cada uno de mis hermanos y cuñados por acompañarme y apoyarme en este largo camino. Gracias también a ellos por haberme regalado a cada uno de mis sobrinos, que son mis luceros en medio de cualquier oscuridad, mi camino para ir a casa. Gracias a cada uno de estos pequeños maestros por enseñarme cada día el camino de la vida. Un gracias muy especial a Pablito y Rebequita porque, sin su amor esencial, sin sus sonrisas auténticas, la vida entera sería más gris. Gracias a estos dos corazones grandes por ser el origen y raíz de mi vocación investigadora, espero no defraudaros nunca.

Gracias a toda mi familia en la fe. Un gracias muy especial para vosotros, porque sé que habéis rezado mucho por mí en mis etapas de desesperación.

Gracias finalmente a Ricardo, el amor de mi vida, por llegar en el momento justo para ser el apoyo necesario en cada momento. Gracias por tu mirada, por tu espera, por tu confianza, por dejarme crecer a tu lado. Gracias por existir. ¡Cuánto hemos deseado que llegase este momento, cuánto hemos luchado! Lo hemos conseguido, amor, juntos lo hemos logrado. Me falta vida para agradecerte.

Gracias a Dios y a la vida que me ha dado tanto.

*“Trata a un ser humano tal como es, y seguirá  
siendo lo que es; trátalo como puede y debe ser y  
se convertirá en lo que puede y debe ser”*

*Johann Wolfgang Goethe*



## PRODUCTIVIDAD CIENTÍFICA DERIVADA DE ESTA TESIS

### **ARTÍCULOS PUBLICADOS**

- Mira-Sánchez, María D.; Castillo-Sánchez, Julián; Morillas-Ruiz, Juana María. Comparative study of rosemary extracts and several synthetic and natural food antioxidants. Relevance of carnosic acid/carnosol ratio. Food Chemistry.  
Online publication: 12-NOV-2019.  
DOI: 10.1016/j.foodchem.2019.125688.

### **COMUNICACIONES A CONGRESOS NACIONALES**

- Mira-Sánchez, María D.; Castillo-Sánchez, Julián; Morillas-Ruiz, Juana María. Título del trabajo: Influencia de la ratio carnósico/carnosol en la inhibición del enranciamiento de aceites de uso alimentario. Nombre del congreso: V Jornadas de Investigación y Doctorado: "Ciencias sin Fronteras". Congreso ámbito geográfico: Nacional. Tipo de participación: Póster. Fecha de celebración: 31 mayo 2019. Entidad organizadora: EDIUCAM. Universidad Católica San Antonio de Murcia.
- Mira-Sánchez, María D.; Castillo-Sánchez, Julián; Morillas-Ruiz, Juana María. Título del trabajo: Relevance of the carnosic acid/carnosol ratio for the level of Rosemary diterpene transfer and improving lamb meat antioxidant status. Nombre del congreso: IV Jornadas de Investigación y Doctorado: Women in Science. Congreso ámbito geográfico: Nacional. Tipo de participación: presentación de un paper relevante en mi campo de investigación, comunicación oral. Fecha de celebración: 18 mayo 2018. Entidad organizadora: EDIUCAM. Universidad Católica San Antonio de Murcia.

- Mira-Sánchez, María D.; Castillo-Sánchez, Julián; Morillas-Ruiz, Juana María. Título del trabajo: Estudio comparativo de capacidad antioxidante entre diversos antioxidantes sintéticos, extractos naturales de romero y otras fuentes vegetales. Nombre del congreso: III Jornadas de Investigación y Doctorado: Reconocimiento de los Doctores en el Mercado Laboral. Congreso ámbito geográfico: Nacional. Tipo de participación: póster. Fecha de celebración: 16 junio 2017. Entidad organizadora: EDIUCAM. Universidad Católica San Antonio de Murcia.
- Mira-Sánchez, María D.; Castillo-Sánchez, Julián; Morillas-Ruiz, Juana María. Título del trabajo: Uso de extractos de romero y otras fuentes vegetales como antioxidantes tecnológicos de grasas y aceites. Estudio comparativo de eficacia frente a antioxidantes sintéticos. Relación estructura-actividad. Nombre del congreso: II Jornadas de Investigación y Doctorado: Doctorado Industrial. Congreso ámbito geográfico: Nacional. Tipo de participación: comunicación oral. Fecha de celebración: 24 junio 2016. Entidad organizadora: EDIUCAM. Universidad Católica San Antonio de Murcia.

#### COMUNICACIONES A CONGRESOS INTERNACIONALES

- Mira-Sánchez, María D.; Castillo-Sánchez, Julián; Morillas-Ruiz, Juana María. Título del trabajo: Estudio comparativo de capacidad antioxidante entre diversos antioxidantes sintéticos, extractos naturales de romero y otras fuentes vegetales. Nombre del congreso: IV Congreso Internacional en Contextos Clínicos y de la salud. Congreso ámbito geográfico: Internacional. Tipo de participación: póster. Fecha de celebración: 8 y 9 marzo 2018. Entidad organizadora: Grupo de Investigación SEJ-581 de la Universidad de Almería, Asociación Universitaria de Educación y Psicología (CINFOPER), e INFOPES. Murcia.

## RESUMEN Y PALABRAS CLAVE

La peroxidación lipídica se define como el deterioro oxidativo de los lípidos (grasas, aceites) a través de la formación de peróxidos. La reacción de estos compuestos con el hidrógeno origina la formación de hidroperóxidos, también llamados productos primarios de oxidación. A partir de estos, suceden una variedad de reacciones secundarias que dan lugar a los productos secundarios de oxidación, que son aldehídos, cetonas, ácidos y otros compuestos de bajo peso molecular. Este proceso tiene como resultado final la disminución de la calidad del sabor y del color, que hace que los alimentos tengan un aspecto poco apetecible, y la acumulación de productos tóxicos de oxidación, lo que plantea un problema importante para la industria alimentaria. La oxidación de los lípidos es una de las principales causas del deterioro de la calidad de los alimentos y los productos alimenticios.

Con el fin de aumentar la estabilidad oxidativa de los alimentos y prolongar así su vida útil, se emplean aditivos antioxidantes. Algunos de los más usados en la industria alimentaria son los fenoles hidroxitolueno butilado (E-321), hidroxianisol butilado (E-320) y *tert*-butilhidroquinona (E-319), y el ácido ascórbico o su forma esterificada con el ácido palmítico, el palmitato de ascorbilo (E-304). Estos antioxidantes sintéticos son eficaces en numerosos sistemas alimentarios, aunque su uso en la industria alimentaria ha disminuido recientemente por la aparición de ciertas controversias en torno a su seguridad y la consecuente demanda de productos más naturales por parte del consumidor.

En los últimos años, los compuestos fenólicos de origen vegetal han despertado una considerable atención debido a sus beneficios funcionales y nutricionales, incluidos los efectos antioxidantes y antimicrobianos. Los antioxidantes de origen natural más empleados en la industria alimentaria, como alternativa al uso de antioxidantes de origen sintético para inhibir o retardar la oxidación lipídica, son el extracto natural rico en tocoferoles (E-306) y el extracto de romero (E-392). Los extractos de romero se obtienen mediante la extracción de las hojas secas de *Rosmarinus officinalis* L y tienen propiedades aromatizantes y antioxidantes. Los diterpenos fenólicos, ácido carnósico y carnosol, han sido identificados como los principales componentes antioxidantes de estos extractos, y

su presencia y distribución han sido descritas durante el crecimiento de la planta de romero.

Con el fin de reducir la aplicación de compuestos de origen sintético, durante las últimas dos décadas se han llevado a cabo muchas investigaciones sobre el uso de extractos vegetales naturales con actividad antioxidante en diversos alimentos. Sin embargo, una deficiencia de la literatura revisada es que la medición de la actividad antioxidante se establece comparando la concentración de antioxidantes sintéticos puros con la de extractos de romero bruto, generalmente sin considerar la concentración de los principios activos antioxidantes ácido carnósico y carnosol que posee el extracto. Esto dificulta la comparación de los resultados de diferentes investigaciones, ya que puede haber tantos resultados de actividad como diferentes extractos de romero en términos de su concentración de diterpenos. En este sentido, es necesario realizar estudios comparativos de antioxidantes alimentarios con igual concentración de principios activos y condiciones de análisis. Esto proporcionaría información útil y realista a la industria alimentaria para evaluar las dosis y los costes de aplicación comparativa de cada sustancia.

Además, existe cierta controversia sobre el mayor o menor poder antioxidante del ácido carnósico en comparación con el carnosol, pero hay pocos estudios que tengan en cuenta cómo la variación en la distribución de estos dos diterpenos podría afectar la actividad antioxidante del extracto de romero.

Con respecto a lo anterior, el proyecto que da lugar a esta tesis plantea dos objetivos principales. En primer lugar, se ha realizado un ensayo comparativo de actividad antirradical y capacidad antilipoperoxidante entre los antioxidantes más utilizados en la industria alimentaria (un total de doce compuestos distintos), utilizando las mismas condiciones de análisis y comparando la actividad entre la misma concentración de principios activos en cada antioxidante. Se han comparado las actividades de los siguientes antioxidantes sintéticos: hidroxitolueno butilado (BHT, hidroxianisol butilado (BHA) y *terc*-butilhidroquinona (TBHQ), y el palmitato de ascorbilo. Como compuestos antioxidantes naturales utilizados actualmente en la industria alimentaria, se han incluido: el extracto natural rico en tocoferoles y cinco extractos de romero con diferentes concentraciones y proporciones de diterpenos fenólicos. Estos extractos se seleccionaron entre los productos de romero más utilizados en el mercado de protección antioxidante de alimentos, en función de su contenido en diterpenos (ácido carnósico+carnosol) y

la relación entre ellos (ácido carnósico/carnosol). Además, en este estudio se han incluido dos extractos vegetales emergentes con probada capacidad antioxidante, utilizados actualmente como suplementos nutricionales: extracto de oliva y extracto de semilla de uva. Ambos han comenzado a ser estudiados como potenciales antioxidantes tecnológicos para su uso en la industria alimentaria. El segundo objetivo ha sido evaluar la importancia de la relación de concentración de ácido carnósico y carnosol para la actividad antioxidante del extracto de romero.

La capacidad antirradical de las sustancias de este estudio se ha determinado mediante el método DPPH. Los resultados de este ensayo en su conjunto muestran que, los cinco extractos de romero, junto con los extractos vegetales de semilla de uva y de oliva, poseen mejor capacidad antirradical que los antioxidantes sintéticos BHT, BHA, TBHQ, palmitato de ascorbilo y el extracto rico en tocoferoles. Dentro de los antioxidantes sintéticos, el TBHQ es el que mejor capacidad antirradical presenta, seguido de BHA, BHT y palmitato de ascorbilo. El extracto natural rico en tocoferoles es el que presenta una menor capacidad antirradical. Los resultados de este ensayo confirman que el ácido carnósico tiene mayor actividad antioxidante que el carnosol, pero sugieren que la presencia de una cierta proporción de carnosol (en un rango de valores de ratio ácido carnósico / carnosol: 2,5-3,0) tiene un efecto sinérgico sobre el ácido carnósico. Además, nuestros resultados han confirmado que la práctica de medir la capacidad antirradical antes de que la reacción alcance la meseta, no ofrece una información realista a la hora de comparar la capacidad antirradical de distintas sustancias. En cuanto a la cinética de reacción de los distintos extractos de romero observamos que el carnosol parece reaccionar más rápidamente con el DPPH<sup>•</sup> que el ácido carnósico.

Para analizar la capacidad antilipoperoxidante de los antioxidantes estudiados, estos se han aplicado sobre tres matrices alimentarias de distinta naturaleza lipídica: aceite de girasol alto oleico (n-9), aceite de semilla de uva (n-6) y aceite de pescado (n-3), y se ha medido la resistencia a la oxidación de las mismas en condiciones de envejecimiento acelerado en estufa y envejecimiento acelerado por el método Rancimat.

En las experiencias de envejecimiento acelerado en estufa se evalúa la capacidad antioxidante tanto a nivel de reducción de compuestos de oxidación primaria (índice de peróxido, IP), como secundaria (índice de *p*-anisidina, IA). En el caso aceite de girasol alto oleico almacenado a 40°C a corto y medio plazo, los

extractos de romero, el TBHQ y el palmitato de ascorbilo son los más eficaces en la reducción de productos de oxidación primaria; los compuestos restantes, tanto naturales como sintéticos, muestran menor eficacia cuantificada como IP. En el caso del aceite de semilla de uva, a corto plazo, el TBHQ, un extracto de romero y el palmitato de ascorbilo son los antioxidantes más eficaces protegiendo frente a la formación de productos de oxidación primaria, y el TBHQ seguido del extracto de semilla de uva, un extracto de romero y el palmitato de ascorbilo a medio plazo. Otros antioxidantes naturales y sintéticos muestran menor eficacia medida como IP. En ambos aceites, a corto plazo, estas condiciones de almacenamiento no promueven la formación de productos de oxidación secundaria en cantidades significativas como para poder valorar el efecto de los diferentes antioxidantes sobre ellos (IA). Igualmente, a medio plazo, solo se observa un reducido aumento en los valores de IA, ligeramente inhibido por el palmitato de ascorbilo, el BHT, el extracto de tocoferoles y un extracto de romero en aceite de girasol. Los resultados obtenidos no permiten establecer de forma suficientemente sólida una relación estructura-actividad antioxidante vs hidroperóxidos de ácidos grasos en las condiciones del estudio para estos dos aceites. No obstante, en relación con la capacidad de protección del aceite de girasol (n-9), se sugieren como elementos importantes en la actividad antioxidante: la presencia simultánea de la estructura  $-O-[C=O]-$  (estructura éster-ácido carboxílico) y la de un grupo catecol o una estructura tipo *orto*-dihidroxi. En el caso del aceite de semilla de uva (n-6), no ha sido posible establecer de forma definida una relación estructura-actividad antioxidante vs hidroperóxidos de ácidos grasos en las condiciones del estudio.

En el aceite de pescado almacenado a 40°C a corto plazo, los productos de oxidación primaria disminuyeron en mayor grado con el uso de varios extractos de romero, el BHT y el extracto de semilla de uva. A corto plazo, estos productos de oxidación primaria formados no se acumulan, sino que desaparecen con el tiempo, transformándose en productos de oxidación secundaria que, en esas condiciones, no son capaces de ser reducidos por ninguno de los antioxidantes estudiados a corto plazo. Sin embargo, a medio plazo, aunque todos los antioxidantes presentan actividad, el extracto de tocoferoles y extracto de semilla de son los que mejor actúan en la reducción de dichos productos de oxidación secundaria, seguidos de varios extractos de romero, siendo TBHQ y BHT muy poco eficaces. En este aceite,

los datos obtenidos en para el valor Totox no fueron representativos de la oxidación total.

Las experiencias realizadas a mayor temperatura de almacenamiento (60°C) nos muestran comportamientos diferentes. En el caso del aceite de girasol alto oleico, solo los extractos de romero muestran capacidad antioxidante frente a los productos de oxidación primaria (IP). El extracto de romero fue también el más eficaz para disminuir la formación de productos de oxidación secundaria (IA) junto con el TBHQ. Los antioxidantes naturales restantes no mostraron actividad para controlar la formación de especies carbonilo (IA). En el caso del aceite de semilla de uva, solo el extracto de romero es capaz de reducir significativamente el nivel de los productos de oxidación primaria (IP), mientras que BHA, extracto de semilla de uva y un extracto de romero logran una mayor reducción de los productos de oxidación secundaria (IA). Finalmente, el aceite de pescado muestra a esta temperatura (60°C) un pronunciado incremento de productos de oxidación secundaria, procedentes de la descomposición de hidroperóxidos, en definitiva, una evidente reducción con el tiempo del valor de IP y un incremento del de IA. El TBHQ, seguido de los extractos de romero, son capaces de reducir este incremento de compuestos carbonilo. El resto de los antioxidantes naturales ensayados no muestran capacidad para disminuir el valor de IA. Con esta distribución de datos para los tres aceites estudiados, no es posible configurar algún tipo de análisis de relación estructura-actividad antioxidante.

En cuanto a la importancia de la relación entre las concentraciones de los diterpenos ácido carnósico y carnosol sobre la actividad antioxidante de los correspondientes extractos, los resultados obtenidos en el ensayo de envejecimiento en estufa fueron diversos. En los aceites de girasol alto oleico y de semilla de uva, el mayor contenido en ácido carnósico se relaciona con una mayor actividad antioxidante respecto al carnosol sobre la disminución de formación de productos de oxidación primaria, pero no en el efecto sobre la formación de productos de oxidación secundaria. No se puede definir en estas condiciones una ratio ácido carnósico/ carnosol óptima para una mejor actividad antioxidante en estos dos aceites. Sin embargo, en el aceite de pescado, los resultados son muy diferentes ya que, sobre todo durante el almacenamiento a 40°C, se aprecia que una ratio ácido carnósico/carnosol en el en torno de 5,0-5,5-6,0 muestra una cierta

sinergia antioxidante respecto a la disminución de productos de oxidación primaria y secundaria.

En la oxidación acelerada mediante el método Rancimat, el TBHQ muestra la mejor capacidad estabilizadora frente a la oxidación lipídica en los tres aceites estudiados. Los cinco extractos de romero son los antioxidantes naturales más efectivos en todos los aceites mostrando un efecto muy superior al resto de los antioxidantes naturales estudiados. Los resultados obtenidos para los distintos extractos de romero confirman que el ácido carnósico muestra mejor capacidad para retardar la oxidación lipídica que el carnosol y sugieren que, la presencia de una cierta proporción de carnosol (en un rango de valores de ratio ácido carnósico/carnosol: 2,0-6,0), genera un efecto antioxidante sinérgico sobre el ácido carnósico.

El extracto de oliva muestra una capacidad superior que antioxidantes BHA, BHT y extracto rico en tocoferoles en los tres aceites estudiados mostrando mayor efecto que AP para proteger aceite de girasol alto oleico, pero no así para aceite de semilla de uva y aceite de pescado. El extracto de semilla de uva no manifiesta capacidad alguna para estabilizar ninguno de los aceites estudiados mediante el método Rancimat. El extracto rico en tocoferoles muestra muy baja capacidad antilipoperoxidante en los tres aceites.

Nuestros resultados constatan, por tanto, que el extracto de romero presenta buena capacidad para retardar la oxidación en alimentos lipídicos y que supone una alternativa óptima tanto al uso de antioxidantes sintéticos, como al uso de extractos ricos en tocoferoles.

A pesar de que los extractos de oliva y semilla de uva, han demostrado un gran potencial antirradical, su naturaleza altamente polar dificulta su disolución en lípidos. Son necesarias futuras investigaciones encaminadas en buscar técnicas adecuadas que aumenten la solubilidad en aceites de estos compuestos y que sean asequibles para su aplicación en la industria alimentaria.

**PALABRAS CLAVE:** ácido carnósico, antioxidante, carnosol, hidroxitirosol, procianidinas, Rancimat.

## ABSTRACT AND KEYWORDS

Lipid peroxidation is defined as the oxidative deterioration of lipids (fats, oils) through the formation of peroxides. The reaction of these compounds with hydrogen originates the formation of hydroperoxides, also called primary oxidation products. From these, a variety of secondary reactions occur that give rise to oxidation by-products, which are aldehydes, ketones, acids and other low molecular weight compounds. The final result of this process is a decrease in the quality of taste and colour, making food unpalatable, and the accumulation of toxic reaction products, which poses a major problem for the food industry. The oxidation of lipids is one of the main causes of the deterioration in the quality of food and food products.

In order to increase the oxidative stability of foods and thus prolong their shelf life, antioxidant additives are used. Some of the most widely used in the food industry are the phenols butylated hydroxytoluene (E-321), butylated hydroxyanisole (E-320) and tert -butylhydroquinone (E-319), and ascorbic acid or its esterified form with palmitic acid, ascorbyl palmitate (E-304). These synthetic antioxidants are effective in many food systems, although their use in the food industry has recently decreased due to the emergence of some controversies about their safety and the consequent consumer demand for more natural products.

In recent years, plant-based phenolic compounds have attracted considerable attention due to their functional and nutritional benefits, including antioxidant and antimicrobial effects. The most commonly used natural antioxidants in the food industry, as an alternative to the use of synthetic antioxidants to inhibit or retard lipid oxidation, are the natural tocopherol-rich extract (E-306) and rosemary extract (E-392). Rosemary extracts are obtained by extracting the dried leaves of *Rosmarinus officinalis* and have flavouring and antioxidant properties. The phenolic diterpenes, carnosic acid and carnosol, have been identified as the main antioxidant components of these extracts, and their presence and distribution have been described during the growth of the rosemary plant.

With the aim of reducing the application of compounds of synthetic origin, during the last two decades much research has been carried out on the use of natural plant extracts with antioxidant activity in various foods. However, a

deficiency of the reviewed literature is that the measurement of antioxidant activity is established by comparing the concentration of pure synthetic antioxidants with that of raw rosemary extracts, generally without considering the concentration of the active antioxidant principles of carnosic acid and carnosol in the extract. This makes it difficult to compare the results of different investigations, since there may be as many results of activity as there are different rosemary extracts in terms of their concentration of diterpenes. In this sense, it is necessary to carry out comparative studies of food antioxidants with the same concentration of active ingredients and analysis conditions. This would provide useful and realistic information to the food industry to evaluate the doses and costs of comparative application of each substance.

In addition, there is some controversy about the greater or lesser antioxidant power of carnosic acid compared to carnosol, but there are few studies that take into account how variation in the distribution of these two diterpenes (carnosic acid/carnosol) might affect the antioxidant activity of rosemary extract.

With respect to the above, the project that gives rise to this thesis has two main objectives. Firstly, a comparative trial of antiradical activity and antilipoperoxidant capacity has been carried out among the antioxidants most used in the food industry (a total of twelve different compounds), using the same analysis conditions and comparing the activity between the same concentration of active principles in each antioxidant. The activities of the following synthetic antioxidants have been compared: butylated hydroxytoluene (BHT), butylated hydroxyanisole (BHA) and *tert*-butylhydroquinone (TBHQ), and ascorbyl palmitate. As natural antioxidant compounds currently used in the food industry, the natural extract rich in tocopherols and five extracts of rosemary with different concentrations and proportions of phenolic diterpenes have been included. These extracts were selected from among the most widely used rosemary products in the food antioxidant protection market. The selection criteria for the five rosemary extracts was the content of diterpenes (carnosic acid + carnosol) and the relationship between them (carnosic acid / carnosol). In addition, this study included two emerging plant extracts with proven antioxidant capacity, currently used as nutritional supplements: olive extract and grape seed extract. Both have begun to be studied as potential technological antioxidants for use in the food

industry. The second objective was to evaluate the importance of the concentration ratio of carnosic acid and carnosol for the antioxidant activity of rosemary extract.

The antiradical activity of the substances in this study has been determined using the DPPH method. The results of this trial as a whole show that the five rosemary extracts, together with the vegetable extracts from grape seeds and olives, have better antiradical activity than the synthetic antioxidants BHT, BHA, TBHQ, ascorbyl palmitate and the natural extract rich in tocopherols. Among the synthetic antioxidants, TBHQ has the best antiradical activity, followed by BHA, BHT and ascorbyl palmitate. The natural extract rich in tocopherols is the one with the lowest antiradical activity. The results of this assay confirm that carnosic acid has greater antioxidant activity than carnosol but suggest that, the presence of a certain proportion of carnosol (in a range of carnosic acid / carnosol ratio values: 2.5-3.0) has a synergistic effect on carnosic acid. Furthermore, our results have confirmed that the practice of measuring antiradical activity before the reaction reaches the plateau does not provide realistic information when comparing the antiradical activity of different substances. Regarding the reaction kinetics of the different rosemary extracts, we observe that carnosol seems to react more rapidly with DPPH<sup>•</sup> than carnosic acid.

In order to analyse the antilipoperoxidant capacity of the antioxidants studied, they have been applied to three food matrices of different lipid nature: high oleic sunflower oil (n-9), grape seed oil (n-6) and fish oil (n-3), and their resistance to oxidation has been measured under conditions of accelerated oven ageing and accelerated ageing by the Rancimat method.

In the experiences of accelerated ageing in the oven, the antioxidant capacity is evaluated both at the level of reduction of primary oxidation compounds (peroxide index, IP) and secondary (p-anisidine index, IA). In the case of high oleic sunflower oil stored at 40°C in the short and medium term, rosemary extracts, TBHQ and ascorbyl palmitate are the most effective in reducing primary oxidation products; the remaining compounds, both natural and synthetic, show lower efficacy quantified as IP. In the case of grape seed oil, in the short term, TBHQ, a rosemary extract and ascorbyl palmitate are the most effective antioxidants protecting against the formation of primary oxidation products, and TBHQ followed by grape seed extract, a rosemary extract and ascorbyl palmitate in the medium term. Other natural and synthetic antioxidants show less efficacy

measured as IP. In both oils, in the short term, these storage conditions do not promote the formation of secondary oxidation products in significant quantities to be able to assess the effect of the different antioxidants on them (IA). Similarly, in the medium term, only a small increase in IA values is observed, slightly inhibited by ascorbyl palmitate, BHT, tocopherol extract and a rosemary extract in sunflower oil. The results obtained do not allow us to establish in a strong enough way a structure-antioxidant activity vs hydroperoxides of fatty acids in the conditions of the study. However, in relation to the protection capacity of sunflower oil (n-9), the following are suggested as important elements in antioxidant activity: the simultaneous presence of the structure  $-O-[C=O]-$  (carboxylic acid ester structure) and that of a catechol group or an ortho-dihydroxy type structure. In the case of grape seed oil (n-6), it has not been possible to establish a definite structure-antioxidant activity vs. fatty acid hydroperoxide relationship under the conditions of the study.

In fish oil stored at 40°C in the short term, primary oxidation products decreased to a greater extent with the use of various rosemary extracts, BHT and grape seed extract. In the short term, these formed primary oxidation products do not accumulate, but disappear over time, becoming secondary oxidation products which, under these conditions, are not capable of being reduced by any of the antioxidants studied in the short term. However, in the medium term, although all antioxidants are active, tocopherol extract and seed extract are the most effective in reducing these secondary oxidation products, followed by several rosemary extracts. TBHQ and BHT were very ineffective. In this oil, the data obtained for the Totox value were not representative of the total oxidation.

The experiments carried out at a higher storage temperature (60°C) show us different behaviours. In the case of high oleic sunflower oil, only the rosemary extracts show antioxidant capacity against primary oxidation (IP) products. Rosemary extract was also the most effective in reducing the formation of secondary oxidation products, this time together with TBHQ. The remaining natural antioxidants showed no activity to control the formation of carbonyl species (IA). In the case of grape seed oil, only rosemary extract is able to significantly reduce the level of primary oxidation (IP) products, while BHA, grape seed extract and rosemary extract achieve a greater reduction of secondary oxidation (IA) products. Finally, fish oil shows at this temperature (60°C) a

pronounced increase of secondary oxidation products, coming from the decomposition of hydroperoxides, in short, an evident reduction with time of the IP value and an increase of the IA value. TBHQ, followed by rosemary extracts, can reduce this increase in carbonyl compounds. The rest of the natural antioxidants tested do not show capacity to decrease the IA value. With this distribution of data for the three oils studied, it is not possible to configure any type of analysis of structure-antioxidant activity relationship.

Regarding the importance of the relationship between the concentrations of the diterpenes carnosic acid and carnosol and the antioxidant activity of the corresponding extracts in, the results obtained in the stove ageing test were diverse. In high oleic sunflower and grape seed oils, the higher carnosic acid content is related to a higher antioxidant activity with respect to the carnosol on the decrease of formation of primary oxidation products, but not on the effect on the formation of secondary oxidation products. An optimal carnosic acid /carnosol ratio for better antioxidant activity in these two oils cannot be defined under these conditions. However, in fish oil, the results are very different since, especially during storage at 40°C, a carnosic acid / carnosol ratio of around 5.0-5.5-6.0 shows a certain antioxidant synergy with respect to the reduction of primary and secondary oxidation products.

In accelerated oxidation using the Rancimat method, TBHQ shows the best stabilizing capacity against lipid oxidation in the three oils studied. The five rosemary extracts are the most effective natural antioxidants in all the oils, showing a far superior effect to the rest of the natural antioxidants studied. The results obtained for the different rosemary extracts confirm that carnosic acid shows a better capacity to retard lipid oxidation than carnosol and suggest that the presence of a certain proportion of carnosol (in a range of carnosic acid / carnosol ratio values: 2.0-6.0) generates a synergic antioxidant effect on carnosic acid.

Olive extract shows a higher antioxidant capacity than BHA, BHT and tocopherol rich extract in the three oils studied showing greater effect than AP to protect high oleic sunflower oil, but not so for grape seed oil and fish oil. Grape seed extract shows no ability to stabilize any of the oils studied by the Rancimat method. The tocopherol-rich extract shows very low antilipoperoxidant capacity in all three oils.

Our results show, therefore, that rosemary extract has a good capacity to retard oxidation in lipidic foods and that it is an optimum alternative both to the use of synthetic antioxidants and to the use of extracts rich in tocopherols.

Although olive and grape seed extracts have shown great anti-radical potential, their highly polar nature makes it difficult to dissolve them in lipids. Future research is needed to find suitable techniques that increase the solubility in oils of these compounds and that are affordable for application in the food industry.

KEY WORDS: carnosic acid, antioxidant, carnosol, hydroxytyrosol, procyanidins, Rancimat.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	25
ÍNDICE DE TABLAS .....	29
ÍNDICE DE FIGURAS .....	33
LISTA DE ABREVIATURAS.....	51
I-INTRODUCCIÓN .....	55
I.1. Lípidos .....	57
I.1.1. Los lípidos en la dieta humana.....	57
I.1.2. Clasificación de lípidos. ....	57
I.2. Deterioro químico de los lípidos: reacciones oxidativas.....	64
I.2.1. Mecanismos de oxidación lipídica .....	65
I.2.2. Formación de productos de descomposición de la oxidación lipídica.....	70
I.3. Antioxidantes .....	72
I.3.1. Antioxidantes de origen sintético .....	75
I.3.2. Antioxidantes de origen natural.....	83
I.3.3. Antioxidantes emergentes de origen natural .....	88
I.3.4. Estudios comparativos de antioxidantes .....	97
II-OBJETIVOS.....	101
Capítulo 1: Extracción y Caracterización de Antioxidantes .....	105
1.1. Introducción y objetivos.....	107
1.2. Extracción de material vegetal.....	110

1.2.1. Consideraciones generales de los métodos de extracción .....	110
1.2.2. Extractos de Romero .....	111
1.2.3. Extracto de semilla de uva .....	113
1.2.4. Extracto de oliva.....	115
1.3. Cuantificación cromatográfica de polifenoles .....	118
1.3.1. Método.....	118
1.3.2. Reactivos .....	118
1.3.3. Procedimiento y expresión de resultados.....	119
1.4. Resultados y discusión .....	123
1.4.1. Antioxidantes de origen sintético .....	123
1.4.2. Antioxidantes de origen natural .....	123
1.5. Conclusiones .....	129
<b>Capítulo 2: Capacidad Antirradical frente a DPPH' .....</b>	<b>131</b>
2.1. Introducción y objetivos.....	133
2.2. Material y métodos.....	135
2.2.1. Material.....	135
2.2.2. Método.....	136
2.2.3. Método de análisis estadístico.....	140
2.3. Resultados y discusión .....	141
2.3.1. Cálculo de EC <sub>50</sub> .....	141
2.3.2. Capacidad estabilizadora del radical DPPH: relación molecular .....	142
2.3.3. Capacidad estabilizadora del radical DPPH: eficacia comparativa. ....	146
2.3.4. Influencia de la relación CA/COL en la actividad antirradical de los extractos de romero .....	157
2.3.5. Influencia del tiempo de reacción en la estimación de la capacidad antirradical. Cinética de la reacción .....	161
2.4. Conclusiones .....	166

**Capítulo 3: Caracterización Lipídica de Aceites Alimentarios.....169**

3.1. Introducción y objetivos.....	171
3.2. Material y método .....	172
3.2.1. Material.....	172
3.2.2. Método.....	172
3.3. Resultados y discusión .....	176
3.3.1. Aceite de girasol alto oleico refinado .....	176
3.3.2. Aceite de semilla de uva refinado.....	177
3.3.3. Aceite de pescado rico DHA .....	180
3.4. Conclusiones .....	186

**Capítulo 4: Determinación de Capacidad Antilipoperoxidante frente a Oxidación Acelerada: Schaal Oven. ....187**

4.1. Introducción y objetivos.....	189
4.2. Material y métodos.....	193
4.2.1. Material.....	193
4.2.2. Método de envejecimiento acelerado en estufa.....	194
4.2.3. Método de determinación de índice de peróxidos (IP) .....	196
4.2.4. Método de determinación de índice de <i>p</i> -anisidina (IA) .....	198
4.2.5. Determinación de oxidación total (Totox) .....	200
4.2.6. Método de análisis estadístico.....	201
4.3. Resultados y discusión .....	202
4.3.1. Envejecimiento acelerado en estufa a 40°C .....	202
4.3.2. Envejecimiento acelerado en estufa a 60°C .....	254
4.3.3. Efecto de la relación ácido carnósico/carnosol del extracto de romero sobre su capacidad de estabilización lipídica.....	272
4.4. Conclusiones .....	279

<b>Capítulo 5: Determinación de Capacidad Antilipoperoxidante frente a Oxidación Acelerada: Rancimat.....</b>	<b>281</b>
5.1. Introducción y objetivos.....	283
5.2. Material y métodos.....	285
5.2.1. Material.....	285
5.2.2. Método.....	286
5.2.3. Método de análisis estadístico.....	292
5.3. Resultados y discusión .....	293
5.3.1. Análisis de pendientes .....	293
5.3.2. Efecto de los antioxidantes sobre la estabilidad oxidativa de las matrices alimentarias.....	297
5.3.3. Efecto de la matriz alimentaria sobre la capacidad estabilizadora de los antioxidantes.....	311
5.3.4. Efecto de la relación ácido carnósico/carnosol del extracto de romero sobre su capacidad de estabilización lipídica.....	319
5.4. Conclusiones .....	325
<b>III - CONCLUSIONES .....</b>	<b>327</b>
<b>IV- ANEXOS.....</b>	<b>335</b>
<b>Anexo 4.1.....</b>	<b>337</b>
<b>Anexo 4.2.....</b>	<b>340</b>
<b>Anexo 4.3.....</b>	<b>343</b>
<b>Anexo 4.4.....</b>	<b>346</b>
<b>V- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>349</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.1.</b> Caracterización de antioxidantes sintéticos.....	123
<b>Tabla 1.2.</b> Concentración de ácido carnósico y carnosol en los distintos extractos de romero.....	125
<b>Tabla 1.3.</b> Concentración de principios activos antioxidantes en extracto de semilla de uva y extracto de oliva. ....	127
<b>Tabla 1.4.</b> Concentración de principios activos antioxidantes en el extracto natural rico en tocoferoles.....	128
<b>Tabla 2.1.</b> Rangos de concentraciones empleadas para cada principio activo antioxidante en el ensayo de capacidad antirradical frente a DPPH* .....	138
<b>Tabla 2.2.</b> Valores de ARP ( $\mu\text{mol PAA}/\mu\text{mol DPPH}^*$ ).....	144
<b>Tabla 2.3.</b> Valores de ARP ( $\mu\text{g PAA}/\text{mL disolvente}$ ).....	148
<b>Tabla 2.4.</b> Efecto de la ratio ácido carnósico/carnosol sobre la capacidad antirradical de los distintos extractos de romero. ....	158
<b>Tabla 2.5.</b> Influencia del tiempo de reacción sobre el ARP ( $\mu\text{mol PAA}/\mu\text{mol DPPH}^*$ ) .....	162
<b>Tabla 3.1.</b> Perfil lipídico del aceite de girasol alto oleico. ....	177
<b>Tabla 3.2.</b> Perfil lipídico del aceite de semilla de uva refinado.....	179

<b>Tabla 3.3.</b> Perfil lipídico del aceite de pescado.....	182
<b>Tabla 4.1.</b> Cantidad de muestra pesada para análisis de índice de peróxidos. ....	197
<b>Tabla 4.2.</b> Tabla resumen de resultados de IP e IA de muestra control de aceite de girasol alto oleico en las pruebas de estabilidad en estufa a 40 y 60°C. ....	255
<b>Tabla 4.3.</b> Tabla resumen de resultados de IP e IA de muestra control de aceite de semilla de uva en las pruebas de estabilidad en estufa a 40 y 60°C.....	261
<b>Tabla 4.4.</b> Tabla resumen de resultados de IP e IA de muestra control de aceite de pescado en las pruebas de estabilidad en estufa a 40 y 60°C.....	266
<b>Tabla 4.5.</b> Resumen comparativo de la influencia de la ratio ácido carnósico/carnosol sobre el efecto antioxidante de los extractos de romero en la prueba de estabilidad en estufa a 40 y 60°C.....	277
<b>Tabla 5.1.</b> Parámetros de determinación de Rancimat.....	290
<b>Tabla 5.2.</b> Efecto de los distintos antioxidantes sobre el tiempo de inducción del aceite de girasol. ....	297
<b>Tabla 5.3.</b> Efecto de los distintos antioxidantes sobre el tiempo de inducción del aceite de semilla de uva.....	302
<b>Tabla 5.4.</b> Efecto de los distintos antioxidantes sobre el tiempo de inducción del aceite de pescado.....	307

**Tabla 5.5.** Efecto de la ratio ácido carnósico/carnosol sobre la estabilidad oxidativa de los aceites de girasol, semilla de uva y pescado determinada por Rancimat.. 319



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura I.1.</b> Representación gráfica de las estructuras de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados.....	58
<b>Figura I.2.</b> Estructura de dobles enlaces en configuración <i>cis</i> y <i>trans</i> de un ácido graso monoinsaturado.....	59
<b>Figura I.3.</b> Sistema pentadiénico y carbono metilénico del ácido linoleico. ....	60
<b>Figura I.4.</b> Estructura de triglicérido mixto: molécula de glicerol esterificada con ácido palmítico ( <i>sn-1</i> ), ácido oleico ( <i>sn-2</i> ) y ácido linoleico ( <i>sn-3</i> ).....	61
<b>Figura I.5.</b> Estructuras de los fosfolípidos más comunes en los alimentos.....	62
<b>Figura I.6.</b> Etapa de iniciación de la oxidación lipídica del ácido linoleico .....	67
<b>Figura I.7.</b> Etapa de propagación de la oxidación lipídica del ácido linoleico. ....	69
<b>Figura I.8.</b> Ejemplo de etapa de terminación de la oxidación lipídica del ácido linoleico.....	69
<b>Figura I.9.</b> Posibles rutas de reacción de un radical libre lipídico producido por $\beta$ -escisión.....	71
<b>Figura I.10.</b> Deslocalización por resonancia del radical fenol. Imagen modificada .....	74

- Figura I.11.** Reacción de terminación entre un radical antioxidante y un radical peroxilo lipídico (ROO<sup>•</sup>)..... 74
- Figura I.12.** Estructura molecular del BHT..... 76
- Figura I.13.** Estructura molecular de los isómeros de BHA: (A) 2-*terc*-butil-4-hidroxianisol y (B) 3-*terc*-butil-4-hidroxianisol. .... 78
- Figura I.14.** Estructura molecular del TBHQ..... 80
- Figura I.15.** Estructura molecular del AP..... 82
- Figura I.16.** Estructura molecular de los distintos isómeros de tocoferol. .... 84
- Figura I.17.** Estructura molecular de los principales diterpenos del extracto de romero: (A) ácido carnósico y (B) carnosol..... 86
- Figura I.18.** Estructura molecular del hidroxitirosol. .... 89
- Figura I.19.** Estructuras de los principales principios activos presentes en el extracto de semilla de uva: (A) (+)-Catequina; (B) (-)-Epicatequina y (C) Tetrámeros de procinidinas. .... 94
- Figura 1.1.** Diagrama de flujo del proceso global de extracción de los extractos de romero: RE1, RE2, RE3, RE4 y RE5. .... 114
- Figura 1.2.** Diagrama de flujo del proceso de extracción del extracto de semilla de uva, GSE ..... 116

- Figura 1.3.** Diagrama de flujo del proceso de extracción del extracto de oliva, OE.  
..... 117
- Figura 1.4.** Imagen de los distintos extractos de romero (RE1, RE2, RE3, RE4 y RE5) obtenidos mediante los procesos descritos en esta memoria..... 124
- Figura 1.5.** Cromatograma HPLC característico de un extracto de romero..... 125
- Figura 1.6.** Imagen de los extractos de semilla de uva (GSE) y oliva (OE) obtenidos mediante los procesos descritos en esta memoria..... 126
- Figura 1.7.** (A) Cromatograma HPLC de extracto de semilla de uva. Picos: 1, procianidinas de 4 o más unidades de catequina; 2, (+)-catequina; 3, (-)-epicatequina. (B) Cromatograma HPLC de extracto de oliva. Picos: 1, hidroxitirsol; 2, tirosol. .... 127
- Figura 1.8.** Cromatograma HPLC del extracto natural rico en tocoferoles (TOC). Picos: 1,  $\gamma$ -tocoferol; 2,  $\alpha$ -tocoferol; 3,  $\delta$ -tocoferol ..... 128
- Figura 2.1.** Representación gráfica de la reacción de reducción del radical DPPH $\cdot$ . (Pérez & FregosoAguilar, 2013) ..... 136
- Figura 2.2.** Microplaca cargada con muestras de antioxidantes a distintas concentraciones y DPPH $\cdot$  ..... 137
- Figura 2.3.** Recta de calibrado de DPPH $\cdot$  ..... 141
- Figura 2.4.** Representación gráfica de la reducción de DPPH $\cdot$  en función de n $^{\circ}$  moles tocoferoles/n $^{\circ}$  moles DPPH $\cdot$  ..... 142

**Figura 2.5.** Representación gráfica de la actividad antirradical frente a DPPH<sup>•</sup> para las muestras estudiadas. Se representa el incremento de la absorbancia a 515 nm en el eje de ordenadas, frente a la concentración de principio activo antioxidante de cada sustancia en el de abscisas expresada como concentración  $\mu\text{molar}$ ..... 143

**Figura 2.6.** Representación gráfica de los valores ARP ( $\mu\text{mol PAA}/\mu\text{mol DPPH}^{\bullet}$ ) obtenidos para cada antioxidante. Los puntos representados en la misma línea horizontal expresan los resultados de las tres repeticiones realizadas para cada sustancia analizada. .... 144

**Figura 2.7.** Análisis estructural de los principios activos antioxidantes estudiados en el ensayo de capacidad antirradical frente a DPPH<sup>•</sup>. .... 147

**Figura 2.8.** Representación gráfica descriptiva de los valores ARP ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) obtenidos para cada antioxidante. Los puntos representados en la misma línea horizontal expresan los resultados de las tres repeticiones realizadas para cada sustancia analizada. .... 149

**Figura 2.9.** Análisis comparativo de ARP ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) de cada antioxidante frente al control Trolox..... 151

**Figura 2.10.** A) Descriptiva de valores medios de ARP ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) por grupos de antioxidantes. B) Análisis comparativo del valor medio de ARP ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) de cada grupo de antioxidantes: SIN (antioxidantes sintéticos), ROM (extractos de romero), NAT (otros antioxidantes naturales), CON (control: Trolox). .... 152

**Figura 2.11.** Análisis comparativo de ARP ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) dentro del grupo de antioxidantes de origen sintético. .... 153

**Figura 2.12.** Análisis comparativo de ARP ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) dentro del grupo de los extractos de romero..... 154

**Figura 2.13.** Análisis comparativo de ARP ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) dentro del grupo de otros antioxidantes naturales. .... 154

**Figura 2.14.** Análisis comparativo de ARP ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) entre sustancias de distintos grupos de antioxidantes. .... 156

**Figura 2.15.** Representación de la actividad antirradical ARP ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (en eje de abscisas) *versus* la ratio ácido carnósco/carnosol (en el eje de ordenadas) ..... 159

**Figura 2.16.** Ruta de oxidación del ácido carnósico. .... 160

**Figura 3.1.** Cromatograma GLC del aceite de girasol alto oleico refinado. Principales picos: 1, ácido palmítico; 2, ácido esteárico; 3, ácido oleico; 4, ácido linoleico..... 183

**Figura 3.2.** Cromatograma GLC del aceite de semilla de uva refinado. Principales picos: 1, ácido palmítico; 2, ácido esteárico; 3, ácido oleico; 4, ácido linoleico.... 184

**Figura 3.3.** Cromatograma GLC del aceite de pescado rico en DHA. Principales picos: 1, ácido eicosapentaenoico; 2, ácido heneicosapentaenoico; 3, ácido docosapentaenoico; 4, ácido docosahexaenoico. .... 185

**Figura 4.1.** Determinación de índice de peróxidos..... 196

**Figura 4.2.** Determinación de índice de *p*-anisidina. .... 199

**Figura 4.3.** Evolución del parámetro IP a lo largo de 35 días y tendencia (estimada con regresión lineal) para cada antioxidante y el blanco en el aceite de girasol alto oleico envejecido a 40°C. En el eje de abscisas se representa el tiempo de envejecimiento (días) y en el de ordenadas se representa IP (meq O<sub>2</sub>/Kg grasa). En la leyenda se refleja para cada antioxidante: la pendiente de la recta (incremento IP/día), su intervalo de confianza al 95% y el p-valor de la diferencia estadística de cada antioxidante respecto al blanco..... 206

**Figura 4.4.** Gráfica comparativa del efecto de los distintos antioxidantes estudiados sobre la velocidad de formación de hidroperóxidos (pendiente) en el aceite de girasol alto oleico envejecido a 40°C. En el eje de ordenadas se muestran los antioxidantes ordenados ascendentemente en función del tamaño de su pendiente. En el eje de abscisas se representa el efecto de cada antioxidante expresado como incremento de IP/día. A la derecha se describe el valor medio de la pendiente junto con su intervalo de confianza al 95% entre paréntesis..... 207

**Figura 4.5.** Mecanismo de peroxidación lipídica..... 209

**Figura 4.6.** Gráfica comparativa del efecto de los distintos antioxidantes estudiados sobre el incremento del parámetro IP entre tiempo 0 y 150 días en el aceite de girasol alto oleico envejecido a 40°C. En el eje de ordenadas se muestran los antioxidantes ordenados ascendentemente en función del incremento de IP. En el eje de abscisas se representa el incremento de IP para cada antioxidante. A la derecha se describe el valor medio del incremento de IP junto con su intervalo de confianza al 95% entre paréntesis..... 210

**Figura 4.7.** Descripción de características estructurales de: palmitato de ascorbilo (AP), ácido carnósico (CA) y carnosol (COL)..... 212

**Figura 4.8.** Evolución del parámetro IA a lo largo de 35 días y tendencia (estimada con regresión lineal) para cada antioxidante y el blanco en el aceite de girasol alto oleico envejecido a 40°C. En el eje de abscisas se representa el tiempo de envejecimiento (días) y en el de ordenadas se representa el parámetro IA. En la leyenda se refleja para cada antioxidante: la pendiente de la recta (incremento IA/día), su intervalo de confianza al 95% y el p-valor de la diferencia estadística de cada antioxidante respecto al blanco..... 214

**Figura 4.9.** Gráfica comparativa del efecto de los distintos antioxidantes estudiados sobre la velocidad de evolución de parámetro IA (pendiente) en el aceite de girasol alto oleico envejecido a 40°C. En el eje de ordenadas se muestran los antioxidantes ordenados ascendentemente en función del tamaño de su pendiente. En el eje de abscisas se representa el efecto de cada antioxidante expresado como incremento de IA/día. A la derecha se describe el valor medio de la pendiente junto con su intervalo de confianza al 95% entre paréntesis..... 215

**Figura 4.10.** Gráfica comparativa del efecto de los distintos antioxidantes estudiados sobre el incremento del parámetro IA entre tiempo 0 y 150 días en el aceite de girasol alto oleico envejecido a 40°C. En el eje de ordenadas se muestran los antioxidantes ordenados ascendentemente en función del incremento de IA. En el eje de abscisas se representa el incremento de IA para cada antioxidante. A la derecha se describe el valor medio del incremento de IA junto con su intervalo de confianza al 95% entre paréntesis. .... 216

**Figura 4.11.** Evolución del valor Totox a lo largo de 35 días y tendencia (estimada con regresión lineal) para cada antioxidante y el blanco en el aceite de girasol alto oleico envejecido a 40°C. En el eje de abscisas se representa el tiempo de envejecimiento (días) y en el de ordenadas se representa el parámetro Totox. En la leyenda se refleja para cada antioxidante: la pendiente de la recta (incremento Totox/día), su intervalo de confianza al 95% y el p-valor de la diferencia estadística de cada antioxidante respecto al blanco. .... 219

**Figura 4.12.** Gráfica comparativa del efecto de los distintos antioxidantes estudiados sobre la velocidad de evolución de valor Totox (pendiente) en el aceite de girasol alto oleico envejecido a 40°C. En el eje de ordenadas se muestran los antioxidantes ordenados ascendentemente en función del tamaño de su pendiente. En el eje de abscisas se representa el efecto de cada antioxidante expresado como incremento de Totox/día. A la derecha se describe el valor medio de la pendiente junto con su intervalo de confianza al 95% entre paréntesis. .... 220

**Figura 4.13.** Gráfica comparativa del efecto de los distintos antioxidantes estudiados sobre el incremento del valor Totox entre tiempo 0 y 150 días en el aceite de girasol alto oleico envejecido a 40°C. En el eje de ordenadas se muestran los antioxidantes ordenados ascendentemente en función del incremento de Totox. En el eje de abscisas se representa el incremento de Totox para cada antioxidante. A la derecha se describe el valor medio del incremento de Totox junto con su intervalo de confianza al 95% entre paréntesis..... 221

**Figura 4.14.** Evolución del parámetro IP a lo largo de 35 días y tendencia (estimada con regresión lineal) para cada antioxidante y el blanco en el aceite de semilla de uva envejecido a 40°C. En el eje de abscisas se representa el tiempo de envejecimiento (días) y en el de ordenadas se representa IP (meq O<sub>2</sub>/Kg grasa). En la leyenda se refleja para cada antioxidante: la pendiente de la recta (incremento IP/día), su intervalo de confianza al 95% y el p-valor de la diferencia estadística de cada antioxidante respecto al blanco..... 225

**Figura 4.15.** Gráfica comparativa del efecto de los distintos antioxidantes estudiados sobre la velocidad de evolución del parámetro IP (pendiente) en el aceite de semilla de uva envejecido a 40°C. En el eje de ordenadas se muestran los antioxidantes ordenados ascendentemente en función del tamaño de su pendiente. En el eje de abscisas se representa el efecto de cada antioxidante expresado como incremento de IP/día. A la derecha se describe el valor medio de la pendiente junto con su intervalo de confianza al 95% entre paréntesis..... 226

**Figura 4.16.** Gráfica comparativa del efecto de los distintos antioxidantes estudiados sobre el incremento del parámetro IP entre tiempo 0 y 150 días en el aceite de semilla de uva envejecido a 40°C. En el eje de ordenadas se muestran los antioxidantes ordenados ascendentemente en función del incremento de IP. En el eje de abscisas se representa el incremento de IP para cada antioxidante. A la derecha se describe el valor medio del incremento de IP junto con su intervalo de confianza al 95% entre paréntesis. .... 227

**Figura 4.17.** Evolución del parámetro IA a lo largo de 35 días y tendencia (estimada con regresión lineal) para cada antioxidante y el blanco en el aceite de semilla de uva envejecido a 40°C. En el eje de abscisas se representa el tiempo de envejecimiento (días) y en el de ordenadas se representa el parámetro IA. En la leyenda se refleja para cada antioxidante: la pendiente de la recta (incremento IA/día), su intervalo de confianza al 95% y el p-valor de la diferencia estadística de cada antioxidante respecto al blanco..... 229

**Figura 4.18.** Gráfica comparativa del efecto de los distintos antioxidantes estudiados sobre la velocidad de evolución de parámetro IA (pendiente) en el aceite de semilla de uva envejecido a 40°C. En el eje de ordenadas se muestran los antioxidantes ordenados ascendentemente en función del tamaño de su pendiente. En el eje de abscisas se representa el efecto de cada antioxidante expresado como incremento de IA/día. A la derecha se describe el valor medio de la pendiente junto con su intervalo de confianza al 95% entre paréntesis..... 230

**Figura 4.19.** Gráfica comparativa del efecto de los distintos antioxidantes estudiados sobre el incremento del parámetro IA entre tiempo 0 y 150 días en el aceite de semilla de uva envejecido a 40°C. En el eje de ordenadas se muestran los antioxidantes ordenados ascendentemente en función del incremento de IA. En el eje de abscisas se representa el incremento de IA para cada antioxidante. A la derecha se describe el valor medio del incremento de IA junto con su intervalo de confianza al 95% entre paréntesis. .... 231

**Figura 4.20.** Evolución del valor Totox a lo largo de 35 días y tendencia (estimada con regresión lineal) para cada antioxidante y el blanco en el aceite de semilla de uva envejecido a 40°C. En el eje de abscisas se representa el tiempo de envejecimiento (días) y en el de ordenadas se representa el parámetro Totox. En la leyenda se refleja para cada antioxidante: la pendiente de la recta (incremento Totox/día), su intervalo de confianza al 95% y el p-valor de la diferencia estadística de cada antioxidante respecto al blanco. .... 234

**Figura 4.21.** Gráfica comparativa del efecto de los distintos antioxidantes estudiados sobre la velocidad de evolución de valor Totox (pendiente) en el aceite de semilla de uva envejecido a 40°C. En el eje de ordenadas se muestran los antioxidantes ordenados ascendentemente en función del tamaño de su pendiente. En el eje de abscisas se representa el efecto de cada antioxidante expresado como incremento de Totox/día. A la derecha se describe el valor medio de la pendiente junto con su intervalo de confianza al 95% entre paréntesis. .... 235

**Figura 4.22.** Gráfica comparativa del efecto de los distintos antioxidantes estudiados sobre el incremento del valor Totox entre tiempo 0 y 150 días en el aceite de semilla de uva envejecido a 40°C. En el eje de ordenadas se muestran los antioxidantes ordenados ascendentemente en función del incremento de Totox. En el eje de abscisas se representa el incremento de Totox para cada antioxidante. A la derecha se describe el valor medio del incremento de Totox junto con su intervalo de confianza al 95% entre paréntesis..... 236

**Figura 4.23.** Evolución del parámetro IP a lo largo de 35 días y tendencia (estimada con regresión lineal) para cada antioxidante y el blanco en el pescado envejecido a 40°C. En el eje de abscisas se representa el tiempo de envejecimiento (días) y en el de ordenadas se representa IP (meq O<sub>2</sub>/Kg grasa). En la leyenda se refleja para cada antioxidante: la pendiente de la recta (incremento IP/día), su intervalo de confianza al 95% y el p-valor de la diferencia estadística de cada antioxidante respecto al blanco. .... 240

**Figura 4.24.** Gráfica comparativa del efecto de los distintos antioxidantes estudiados sobre la velocidad de evolución del parámetro IP (pendiente) en el pescado envejecido a 40°C. En el eje de ordenadas se muestran los antioxidantes ordenados ascendentemente en función del tamaño de su pendiente. En el eje de abscisas se representa el efecto de cada antioxidante expresado como incremento de IP/día. A la derecha se describe el valor medio de la pendiente junto con su intervalo de confianza al 95% entre paréntesis..... 241

**Figura 4.25.** Gráfica comparativa del efecto de los distintos antioxidantes estudiados sobre el incremento del parámetro IP entre tiempo 0 y 150 días en el aceite de pescado envejecido a 40°C. En el eje de ordenadas se muestran los antioxidantes ordenados ascendentemente en función del incremento de IP. En el eje de abscisas se representa el incremento de IP para cada antioxidante. A la derecha se describe el valor medio del incremento de IP junto con su intervalo de confianza al 95% entre paréntesis. .... 242

**Figura 4.26.** Evolución del parámetro IA a lo largo de 35 días y tendencia (estimada con regresión lineal) para cada antioxidante y el blanco en el aceite de pescado envejecido a 40°C. En el eje de abscisas se representa el tiempo de envejecimiento (días) y en el de ordenadas se representa el parámetro IA. En la leyenda se refleja para cada antioxidante: la pendiente de la recta (incremento IA/día), su intervalo de confianza al 95% y el p-valor de la diferencia estadística de cada antioxidante respecto al blanco. .... 245

**Figura 4.27.** Gráfica comparativa del efecto de los distintos antioxidantes estudiados sobre la velocidad de evolución de parámetro IA (pendiente) en el aceite de pescado envejecido a 40°C. En el eje de ordenadas se muestran los antioxidantes ordenados ascendentemente en función del tamaño de su pendiente. En el eje de abscisas se representa el efecto de cada antioxidante expresado como incremento de IA/día. A la derecha se describe el valor medio de la pendiente junto con su intervalo de confianza al 95% entre paréntesis..... 246

**Figura 4.28.** Gráfica comparativa del efecto de los distintos antioxidantes estudiados sobre el incremento del parámetro IA entre tiempo 0 y 150 días en el aceite de pescado envejecido a 40°C. En el eje de ordenadas se muestran los antioxidantes ordenados ascendentemente en función del incremento de IA. En el eje de abscisas se representa el incremento de IA para cada antioxidante. A la derecha se describe el valor medio del incremento de IA junto con su intervalo de confianza al 95% entre paréntesis. .... 247

**Figura 4.29.** Evolución del valor Totox a lo largo de 35 días y tendencia (estimada con regresión lineal) para cada antioxidante y el blanco en el aceite de pescado envejecido a 40°C. En el eje de abscisas se representa el tiempo de envejecimiento (días) y en el de ordenadas se representa el parámetro Totox. En la leyenda se refleja para cada antioxidante: la pendiente de la recta (incremento Totox/día), su intervalo de confianza al 95% y el p-valor de la diferencia estadística de cada antioxidante respecto al blanco. .... 251

**Figura 4.30.** Gráfica comparativa del efecto de los distintos antioxidantes estudiados sobre la velocidad de evolución de valor Totox (pendiente) en el aceite de pescado envejecido a 40°C. En el eje de ordenadas se muestran los antioxidantes ordenados ascendentemente en función del tamaño de su pendiente. En el eje de abscisas se representa el efecto de cada antioxidante expresado como incremento de Totox/día. A la derecha se describe el valor medio de la pendiente junto con su intervalo de confianza al 95% entre paréntesis. .... 252

**Figura 4.31.** Gráfica comparativa del efecto de los distintos antioxidantes estudiados sobre el incremento del valor Totox entre tiempo 0 y 150 días en el aceite de pescado envejecido a 40°C. En el eje de ordenadas se muestran los antioxidantes ordenados ascendentemente en función del incremento de Totox. En el eje de abscisas se representa el incremento de Totox para cada antioxidante. A la derecha se describe el valor medio del incremento de Totox junto con su intervalo de confianza al 95% entre paréntesis. .... 253

**Figura 4.32.** Esquema representativo de la evolución de los índices IP e IA en la muestra control del aceite de girasol alto oleico en función del tiempo (t) y la temperatura ( $T^a$ ). La velocidad (V) de incremento de IP e IA en un periodo de tiempo determinado se expresa en unidades de IP ó IA/día. .... 256

**Figura 4.33.** Gráfica comparativa del efecto de los distintos antioxidantes estudiados sobre el incremento del parámetro IP entre tiempo 0 y 35 días en el aceite de girasol alto oleico envejecido a 60°C. En el eje de ordenadas se muestran los antioxidantes ordenados ascendentemente en función del incremento de IP. En el eje de abscisas se representa el incremento de IP para cada antioxidante. A la derecha se describe el valor medio del incremento de IP junto con su intervalo de confianza al 95% entre paréntesis. .... 259

**Figura 4.34.** Gráfica comparativa del efecto de los distintos antioxidantes estudiados sobre el incremento del parámetro IA entre tiempo 0 y 35 días en el aceite de girasol alto oleico envejecido a 60°C. En el eje de ordenadas se muestran los antioxidantes ordenados ascendentemente en función del incremento de IA. En el eje de abscisas se representa el incremento de IA para cada antioxidante. A la derecha se describe el valor medio del incremento de IA junto con su intervalo de confianza al 95% entre paréntesis. .... 260

**Figura 4.35.** Esquema representativo de la evolución de los índices IP e IA en la muestra control del aceite de semilla de uva en función del tiempo (t) y la temperatura ( $T^a$ ). La velocidad (V) de incremento de IP e IA en un periodo de tiempo determinado se expresa en unidades de IP ó IA/día. .... 262

**Figura 4.36.** Gráfica comparativa del efecto de los distintos antioxidantes estudiados sobre el incremento del parámetro IP entre tiempo 0 y 35 días en el aceite de semilla de uva envejecido a 60°C. En el eje de ordenadas se muestran los antioxidantes ordenados ascendentemente en función del incremento de IP. En el eje de abscisas se representa el incremento de IP para cada antioxidante. A la derecha se describe el valor medio del incremento de IP junto con su intervalo de confianza al 95% entre paréntesis. .... 264

**Figura 4.37.** Gráfica comparativa del efecto de los distintos antioxidantes estudiados sobre el incremento del parámetro IA entre tiempo 0 y 35 días en el aceite de semilla de uva envejecido a 60°C. En el eje de ordenadas se muestran los antioxidantes ordenados ascendentemente en función del incremento de IA. En el eje de abscisas se representa el incremento de IA para cada antioxidante. A la derecha se describe el valor medio del incremento de IA junto con su intervalo de confianza al 95% entre paréntesis. .... 265

**Figura 4.38.** Esquema representativo de la evolución de los índices IP e IA en la muestra control del aceite de pescado en función del tiempo (t) y la temperatura ( $T^a$ ). La velocidad (V) de incremento de IP e IA en un periodo de tiempo determinado se expresa en unidades de IP ó IA/día. .... 266

**Figura 4.39.** Gráfica comparativa del efecto de los distintos antioxidantes estudiados sobre el incremento del parámetro IP entre tiempo 0 y 35 días en el aceite de pescado envejecido a 60°C. En el eje de ordenadas se muestran los antioxidantes ordenados ascendentemente en función del incremento de IP. En el eje de abscisas se representa el incremento de IP para cada antioxidante. A la derecha se describe el valor medio del incremento de IP junto con su intervalo de confianza al 95% entre paréntesis. .... 270

- Figura 4.40.** Gráfica comparativa del efecto de los distintos antioxidantes estudiados sobre el incremento del parámetro IA entre tiempo 0 y 35 días en el aceite de pescado envejecido a 60°C. En el eje de ordenadas se muestran los antioxidantes ordenados ascendentemente en función del incremento de IA. En el eje de abscisas se representa el incremento de IA para cada antioxidante. A la derecha se describe el valor medio del incremento de IA junto con su intervalo de confianza al 95% entre paréntesis. .... 271
- Figura 5.1.** Representación del fundamento del método Rancimat. .... 287
- Figura 5.2.** Ejemplo de grafica conductividad/tiempo con el cálculo del Tiempo de Inducción (TI) obtenida con el método Rancimat. .... 287
- Figura 5.3.** Ejemplo de distribución de las muestras en el ensayo Rancimat. .... 289
- Figura 5.4.** Equipo Rancimat montado y preparado para la determinación. .... 289
- Figura 5.5.** Efecto de cada antioxidante sobre el incremento del tiempo de estabilidad de cada matriz alimentaria. El eje de ordenadas refleja cada uno de los antioxidantes estudiados; en el eje de abscisas se representa el efecto como % de incremento de tiempo de estabilidad por cada 50 ppm de principio activo antioxidante; la columna de la derecha describe el valor medio del efecto junto con su intervalo de confianza al 95% entre paréntesis..... 294
- Figura 5.6.** Gráfica descriptiva del efecto de cada antioxidante sobre la estabilidad oxidativa del aceite de girasol alto oleico en función de la concentración. En el eje de abscisas se describe la concentración (expresado en ppm de principio activo antioxidante); en el eje de ordenadas se refleja el factor de estabilidad (expresado como % de incremento de tiempo de inducción sobre el tiempo de referencia a concentración=0). .... 298

**Figura 5.7.** Gráfica comparativa del efecto de cada antioxidante sobre la estabilidad oxidativa del aceite de girasol alto oleico. En el eje de ordenadas se muestran los antioxidantes en orden ascendente en función de su efecto. En el eje de abscisas se representa el efecto de cada antioxidante (expresado como % de incremento de tiempo de inducción por cada 50ppm de principio activo antioxidante). A la derecha se describe el valor medio del efecto junto con su intervalo de confianza al 95% entre paréntesis. .... 299

**Figura 5.8.** Gráfica descriptiva del efecto de cada antioxidante sobre la estabilidad oxidativa del aceite de semilla de uva en función de la concentración. En el eje de abscisas se describe la concentración (expresado en ppm de principio activo antioxidante); en el eje de ordenadas se refleja el factor de estabilidad (expresado como % de incremento de tiempo de inducción sobre el tiempo de referencia a concentración=0). .... 303

**Figura 5.9.** Gráfica comparativa del efecto de cada antioxidante sobre la estabilidad oxidativa del aceite de semilla de uva. En el eje de ordenadas se muestran los antioxidantes en orden ascendente en función de su efecto. En el eje de abscisas se representa el efecto de cada antioxidante (expresado como % de incremento de tiempo de inducción por cada 50ppm de principio activo antioxidante). A la derecha se describe el valor medio del efecto junto con su intervalo de confianza al 95% entre paréntesis. .... 304

**Figura 5.10.** Gráfica descriptiva del efecto de cada antioxidante sobre la estabilidad oxidativa del aceite de pescado en función de la concentración. En el eje de abscisas se describe la concentración (expresado en ppm de principio activo antioxidante); en el eje de ordenadas se refleja el factor de estabilidad (expresado como % de incremento de tiempo de inducción sobre el tiempo de referencia a concentración=0). .... 308

**Figura 5.11.** Gráfica comparativa del efecto de cada antioxidante sobre la estabilidad oxidativa del aceite de pescado. En el eje de ordenadas se muestran los antioxidantes en orden ascendente en función de su efecto. En el eje de abscisas se representa el efecto de cada antioxidante (expresado como % de incremento de tiempo de inducción por cada 50ppm de principio activo antioxidante). A la derecha se describe el valor medio del efecto junto con su intervalo de confianza al 95% entre paréntesis. .... 309

**Figura 5.12.** Gráfica comparativa del efecto del grupo de los antioxidantes sintéticos sobre el aceite de girasol alto oleico (GIR), el aceite de semilla de uva (SEM) y el aceite de pescado (PES). En el eje de ordenadas se muestran los antioxidantes en orden ascendente en función de su efecto-junto al aceite sobre el que ejercen dicho efecto. En el eje de abscisas se representa el efecto de cada antioxidante (expresado como % de incremento de tiempo de inducción por cada 50ppm de principio activo antioxidante). A la derecha se describe el valor medio del efecto junto con su intervalo de confianza al 95% entre paréntesis. .... 314

**Figura 5.13.** Gráfica comparativa del efecto del grupo de los extractos de romero sobre el aceite de girasol alto oleico (GIR), el aceite de semilla de uva (SEM) y el aceite de pescado (PES). En el eje de ordenadas se muestran los antioxidantes en orden ascendente en función de su efecto-junto al aceite sobre el que ejercen dicho efecto. En el eje de abscisas se representa el efecto de cada antioxidante (expresado como % de incremento de tiempo de inducción por cada 50ppm de principio activo antioxidante). A la derecha se describe el valor medio del efecto junto con su intervalo de confianza al 95% entre paréntesis. .... 317

**Figura 5.14.** Gráfica comparativa del efecto del grupo de otros extractos naturales sobre el aceite de girasol alto oleico (GIR), el aceite de semilla de uva (SEM) y el aceite de pescado (PES). En el eje de ordenadas se muestran los antioxidantes en orden ascendente en función de su efecto-junto al aceite sobre el que ejercen dicho efecto. En el eje de abscisas se representa el efecto de cada antioxidante (expresado como % de incremento de tiempo de inducción por cada 50ppm de principio activo

antioxidante). A la derecha se describe el valor medio del efecto junto con su intervalo de confianza al 95% entre paréntesis.....318

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>µL:</b>	Microlitro
<b>µm:</b>	Micrometro/micras
<b>ADI:</b>	Ingesta diaria admisible
<b>AFC:</b>	Processing Aids and Materials in Contact with Food
<b>ANS:</b>	Comisión técnica de aditivos alimentarios y fuentes de nutrientes añadidos a los alimentos
<b>AOCS:</b>	Sociedad americana de químicos de aceites
<b>AOM:</b>	Método de oxígeno activo
<b>AP:</b>	Palmitato de ascorbilo
<b>ARA:</b>	Ácido Araquidónico
<b>ARP:</b>	Poder antirradical
<b>BHT:</b>	Butil hidroxitolueno
<b>BHA:</b>	Butil hidroxianisol
<b>BPF:</b>	Buenas prácticas de fabricación
<b>CA:</b>	Ácido carnósico
<b>CAS:</b>	Chemical Abstracts Service
<b>CG:</b>	Cromatograma
<b>COL:</b>	Carnosol
<b>DHA:</b>	Ácido Docosahexaenoico
<b>DMSO:</b>	Dimetilsufóxido
<b>EAFUS:</b>	Everything Added to Food in the United States
<b>EC50:</b>	Concentración de sustancia que reduce el 50% de DPPH
<b>EFSA:</b>	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
<b>EINECS:</b>	European Inventory of Existing Commercial chemical Substances

<b>EPA:</b>	Ácido Eicosapentaenoico
<b>FA:</b>	Ácido graso
<b>FAME:</b>	Éster metílico de ácido graso
<b>FE:</b>	Factor de estabilización
<b>FID:</b>	Detector de ionización de llama
<b>FRS:</b>	Compuestos captadores de radicales libres
<b>g:</b>	Gramos
<b>GIR:</b>	Aceite de girasol alto oleico refinado
<b>GLC:</b>	Cromatografía de gas-líquido
<b>GRAS:</b>	Generalmente reconocido como seguro
<b>GSE:</b>	Extracto de semilla de uva
<b>HPLC:</b>	Cromatografía líquida de alto rendimiento
<b>HT:</b>	Hidroxitirosol
<b>IA:</b>	Índice de <i>p</i> -anisidina
<b>IP:</b>	Índice de peróxidos
<b>Kcal:</b>	Kilocalorias
<b>Kg:</b>	Kilogramo
<b>L·:</b>	Radical alquilo
<b>LO·:</b>	Radical alcoxilo
<b>LOO·:</b>	Radical peroxilo
<b>mg:</b>	Miligramo
<b>min:</b>	Minutos
<b>mL:</b>	Mililitros
<b>MPL:</b>	Límite máximo permitido
<b>MUFA:</b>	Ácido grasos monoinsaturados
<b>OE:</b>	Extracto de oliva
<b>OH·:</b>	Radical hidroxilo
<b>OPCs:</b>	Procianidinas Oligoméricas

<b>OSI:</b>	Índice de estabilidad oxidativa
<b>p/p:</b>	Peso/peso
<b>p/v:</b>	Peso/volumen
<b>PA :</b>	Ácido fosfatídico
<b>PAA:</b>	Principio activo antioxidante
<b>PC:</b>	Fosfatidilcolina
<b>PE:</b>	Fosfatidiletanolamina
<b>PES:</b>	Aceite de pescado alto DHA
<b>PI:</b>	Fosfatidilinositol
<b>PL:</b>	Fosfolípidos
<b>ppm:</b>	Partes por millón
<b>PS:</b>	Fosfatidilserina
<b>PUFA:</b>	Ácidos grasos poliinsaturados
<b>QS:</b>	Quantum satis
<b>RE:</b>	Extracto de romero
<b>RF:</b>	Factor de respuesta
<b>ROO' :</b>	Radical peroxilo lipídico
<b>ROS:</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>Rt:</b>	Tiempo de retención
<b>SEM :</b>	Aceite de semilla de uva refinado
<b>SFA:</b>	Ácidos grasos saturados
<b>t:</b>	Tiempo
<b>Tª:</b>	Temperatura
<b>TBHQ:</b>	<i>Terc</i> -butilhidroquinona
<b>TG:</b>	Triglicéridos
<b>TI:</b>	Tiempo de inducción
<b>TOC:</b>	Extracto natural rico en tocoferoles
<b>TOTOX:</b>	Valor de oxidación total

**UFA:** Ácidos grasos insaturados

## I-INTRODUCCIÓN



## I-INTRODUCCIÓN

### I.1. LÍPIDOS

#### I.1.1. Los lípidos en la dieta humana.

Los lípidos poseen un efecto muy significativo sobre la calidad alimentaria, incluso aun cuando estos suponen solo una pequeña proporción de su composición. Los principales componentes lipídicos de los alimentos son los triacilgliceroles, comúnmente designados como grasas neutras o triglicéridos. Los lípidos no solo contribuyen al sabor, olor, color y textura, sino que también confieren la capacidad de generar sensación de saciedad y palatabilidad a los alimentos. Nutricionalmente, los lípidos proporcionan una fuente concentrada de calorías (9 Kcal por gramo) que es aproximadamente el doble que en las proteínas o los carbohidratos. Además, también aportan nutrientes esenciales, es decir, que no pueden ser sintetizados por el organismo, incluyendo ácido linoleico, ácido linolénico y vitaminas liposolubles (A, E, D y K).

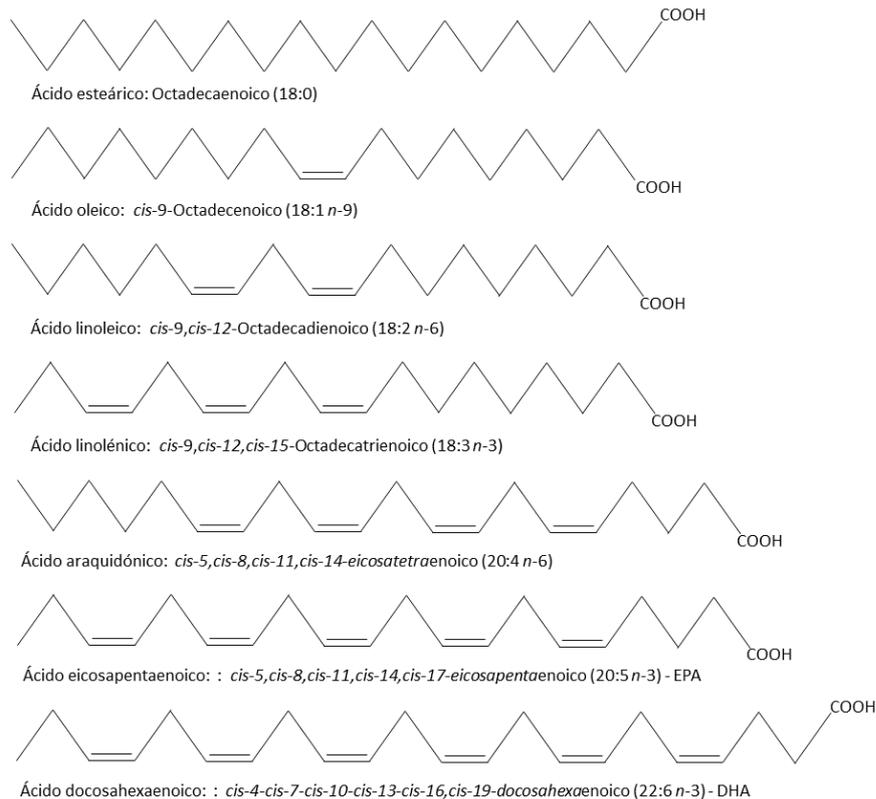
#### I.1.2. Clasificación de lípidos.

Los principales tipos de lípidos a los que nos vamos a referir en este apartado incluyen ácidos grasos libres, triglicéridos, constituidos por tres ácidos grasos esterificados con una molécula de glicerol y fosfoglicéridos o fosfolípidos, constituidos por ácidos grasos esterificados con una molécula de glicerol y que contienen ácido fosfórico y bases orgánicas.

##### *I.1.2.1. Ácidos Grasos*

Los ácidos grasos (FA) son compuestos que contienen una cadena alifática con un grupo carboxilo. Como en el mecanismo biológico de alargamiento de la cadena de los FA se añaden dos carbonos simultáneamente, la mayor parte de los FA naturales están formados por una cadena lineal con número par de átomos de carbono, aunque existen algunas excepciones. Los FA se clasifican generalmente en

saturados e insaturados, conteniendo estos últimos dobles enlaces en su cadena (Figura I.1).

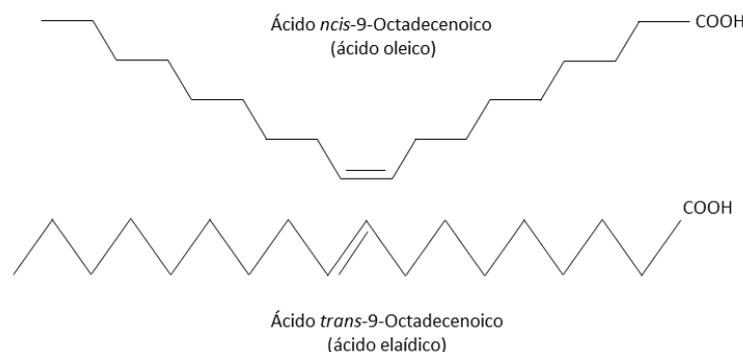


**Figura I.1.** Representación gráfica de las estructuras de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados.

Los ácidos grasos saturados (SFA) poseen comúnmente una cadena recta con un número par de carbonos y una longitud de cadena de 12 a 22 carbonos. Los nombres comunes de los FA existen para la mayoría de los de cadena par y algunos de cadena impar, muchos de ellos proceden del nombre de la fuente de los que derivan o fueron aislados por primera vez. También puede usarse un sistema numérico para nombres abreviados donde el primer número indica el número de carbonos de la cadena del FA y el segundo, el número de dobles enlaces. El ácido

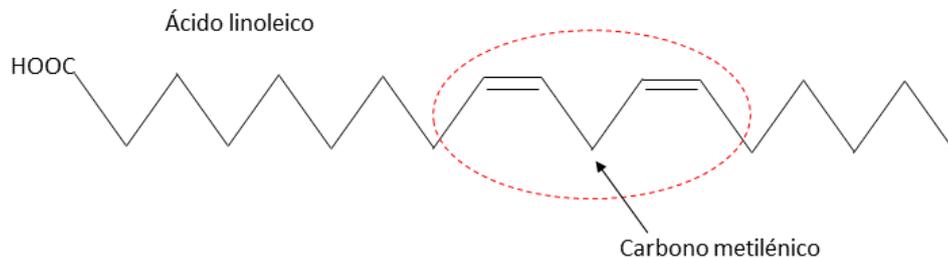
mirístico, con 14 carbonos, se designa como 14:0 (esto es, 14 átomos de carbono sin dobles enlaces), el ácido palmítico, con 16 carbonos, como 16:0 y el ácido esteárico con 18 carbonos, como 18:0.

Los ácidos grasos que contienen dobles enlaces en su cadena alifática son denominados ácidos grasos insaturados (UFA) y estos pueden ser monoinsaturados (MUFA) o polinsaturados (PUFA). El ácido oleico es un MUFA que posee un doble enlace en posición *cis* en la posición del carbono número 9 (contando a partir del grupo carboxilo terminal del FA), se designa como 18:1 *n*-9. El símbolo "n" indica la posición del doble enlace contando a partir del metilo terminal de la cadena de 18 carbonos de este FA. Este sistema de nomenclatura resulta útil para agrupar a los FA sobre la base de su actividad biológica y su origen biosintético, ya que muchas enzimas reconocen a los FA a partir del metilo terminal libre de la molécula cuando está esterificada con glicerol. Por ejemplo, los FA n-3 muestran frecuentemente similar bioactividad en su capacidad para disminuir los niveles de TG en sangre (Simopoulos, 1999). El ácido elaídico posee la misma estructura que el ácido oleico excepto por presentar su doble enlace en configuración *trans*. La configuración natural de los dobles enlaces en los UFA es *cis*. En esta configuración los carbonos de la cadena alifática se disponen en el mismo plano respecto al doble enlace, mientras que, los dobles enlaces *trans* tienen los sustituyentes más voluminosos de los carbonos en planos opuestos (Figura I.2).



**Figura I.2.** Estructura de dobles enlaces en configuración *cis* y *trans* de un ácido graso monoinsaturado.

Los PUFA se caracterizan por poseer dos o más dobles enlaces en posición *cis* separados por un grupo metileno simple o una estructura 1,4-dieno, configuración denominada frecuentemente sistema pentadiénico (Figura I.3). El ácido linoleico, con dos dobles enlace *cis* en las posiciones 9 y 12, se designa como 18:2 *n*-6 (9, 12). El ácido linolénico es 18:3 *n*-3 (9, 12, 15); el ácido araquidónico (ARA) es 20:4 *n*-6 (5, 8, 11, 14); el ácido eicosapentaenoico (EPA) es 20:5 *n*-3 (5, 8, 11, 14, 17) y el ácido docosahexaenoico (DHA) es 22:6 *n*-3 (4, 7, 10, 13, 16, 19). Los ácidos linoleico y linolénico son ácidos grasos esenciales porque no pueden ser sintetizados en cuerpo humano. Se consideran también muy importantes los ácidos grasos EPA y DHA por su acción moduladora en la biosíntesis de derivados oxigenados del ácido graso ARA llamados eicosanoides, los cuales desempeñan funciones hormonales y juegan un papel muy importante en el proceso inflamatorio (Frankel, 2005a).



**Figura I.3.** Sistema pentadiénico y carbono metilénico del ácido linoleico.

Los FA se presentan principalmente en forma de ésteres de glicerol, bien como triglicéridos o bien como fosfolípidos.

#### *1.1.2.2. Triglicéridos*

Los triglicéridos (TG) constituyen alrededor del 99% de los aceites vegetales y lípidos alimentarios. Los FA no suelen encontrarse de manera libre en los tejidos porque son citotóxicos, debido a su capacidad de romper la membrana celular. Una vez que estos ácidos son esterificados con glicerol disminuye su citotoxicidad (Iwig, Glaesser, Fass, & Struck, 2004). Se denominan TG simples, cuando la molécula de glicerol está esterificada con un sólo tipo de FA, o mixtos, si contienen más de un

tipo (Figura I.4). Los TG que se encuentran en la naturaleza suelen ser mezclas complejas de TG simples y mixtos y su composición refleja la concentración relativa de los distintos FA. Los TG ricos en SFA se encuentran en estado sólido a temperatura ambiente y se denominan sebos o grasas, mientras que los ricos en UFA permanecen líquidos a temperatura ambiente y se denominan aceites. El carbono central de un TG muestra quiralidad si los carbonos terminales del glicerol están esterificados con diferentes FA. Los carbonos del glicerol se diferencian mediante una numeración estereoespecífica (*sn*) de manera que, si el TG se muestra en la posición planar de Fischer, los carbonos se numeran del 1 al 3 desde arriba hacia abajo. Las propiedades físicas, reológicas y de textura de los TG depende en gran medida, no solo de su composición relativa de FA, también de su distribución entre las posiciones 1-, 2- ó 3- en la molécula de glicerol (Frankel, 2005c; McClements & Decker, 2010). Los TG pueden ser hidrolizados tanto química como enzimáticamente para producir una mezcla diglicéridos, monoglicéridos, ácidos grasos libres y glicerol.

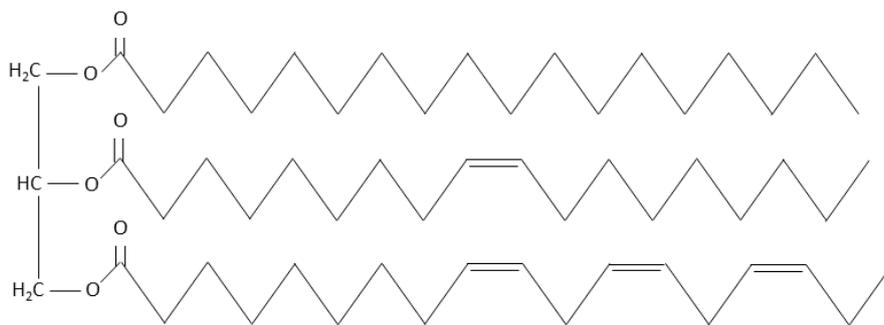
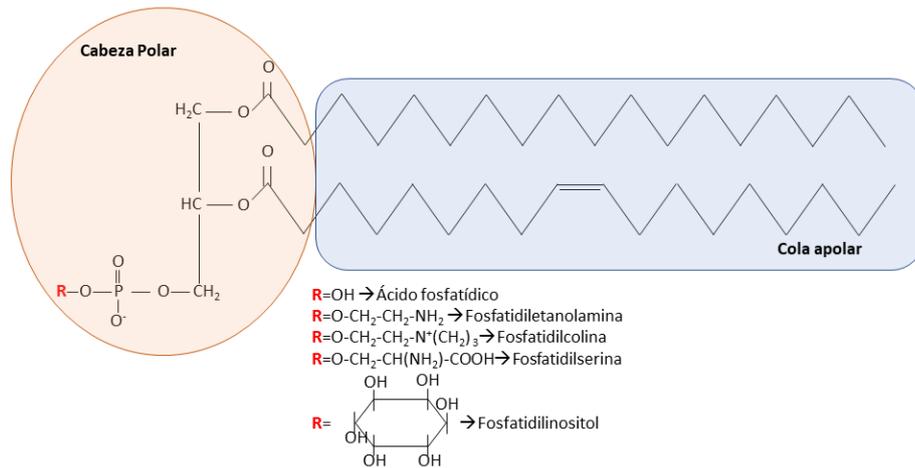


Figura I.4. Estructura de triglicérido mixto: molécula de glicerol esterificada con ácido palmítico (*sn-1*), ácido oleico (*sn-2*) y ácido linoleico (*sn-3*).

#### I.1.2.3. Fosfoglicéridos

Los fosfoglicéridos, también llamados fosfolípidos (PL) son lípidos que presentan una característica estructural común, que es la presencia de ácido fosfatídico (PA). El ácido fosfatídico está constituido por una molécula de glicerol

unida mediante enlace éster a dos FA en los carbonos *sn*-1 y *sn*-2, y a una molécula de ácido fosfórico en el carbono *sn*-3. En la naturaleza, el ácido fosfatídico suele encontrarse unido, a través del ácido fosfórico, a diferentes compuestos de naturaleza polar, dando lugar a los diferentes PL. Algunos ejemplos de PL son la fosfatidilcolina (PC) y fosfatidiletanolamina (PE), cuando el ácido fosfórico se une a las bases nitrogenadas colina o etanolamina; la fosfatidilserina (PS), cuando se une a un aminoácido como la serina; y el fosfatidilinositol (PI), cuando se une a un azúcar-alcohol cíclico como el inositol. (Figura I.5.). Todas estas moléculas tienen en común su naturaleza marcadamente polar.



**Figura I.5.** Estructuras de los fosfolípidos más comunes en los alimentos.

La estructura molecular de los PL presenta una parte apolar (constituida por las cadenas alifáticas de los FA) y una cabeza polar (constituida por el ácido fosfórico y el compuesto polar al que se encuentra unido) (Figura I.5). Esta naturaleza anfipática es la que confiere a los PL su principal función biológica que la de ser componentes esenciales de la bicapa de las membranas celulares. A menudo, los FA que forman parte de los fosfolípidos son de naturaleza insaturada con el fin de evitar la cristalización a temperatura ambiente, puesto que es necesario que las membranas celulares mantengan su fluidez.

Los PL son componentes minoritarios en los aceites vegetales crudos obtenidos bien por extracción con disolventes o bien por presión de las semillas

oleaginosas. Gran parte de ellos son retirados de los aceites en el proceso de desgomado, donde son separados como una mezcla con TG conocida como lecitina. La posición *sn*-1 en la PC de origen animal es generalmente esterificada con SFA, mientras que la posición *sn*-2 contiene PUFA. La lecitina obtenida a partir de las semillas de soja es una mezcla de PC (20-23%), PE (16-21%) y PI (12-18%), y es usada como un importante emulgente en alimentos gracias a la actividad superficial de los PL.

### *I.1.2.3. Componentes minoritarios*

Las grasas y aceites contienen cantidades variables (1-2%) de componentes “no glicéridos” que incluyen hidrocarburos como el escualeno y los carotenoides, esteroides, tocoferoles y tocotrienoles, clorofilas, vitamina A (retinol) y vitamina D (colecalfiferol). Solo los tocoferoles, carotenoides y clorofilas tienen un efecto significativo sobre la estabilidad oxidativa de grasas y aceites. Los tocoferoles son los antioxidantes más importantes y, debido a su alta termoestabilidad, una proporción relativamente grande (60-70%) permanece en los aceites después del procesado. La actividad antioxidante de los tocotrienoles, presentes principalmente en el aceite de palma, no está completamente garantizada en los alimentos después de su procesado. Los carotenoides son inhibidores efectivos frente a la fotooxidación por su capacidad para estabilizar el oxígeno singlete u oxígeno atómico, una forma muy reactiva de oxígeno que es responsable de este tipo de oxidación. Para la mayoría de los aceites comestibles, gran parte de los carotenoides son destruidos durante su procesado, en la etapa de desodorización a elevadas temperaturas. En los aceites de oliva y de maíz, el color amarillo conferido por la presencia de carotenoides es una característica deseable generalmente, por lo que es mantenido tanto por omisión total o parcial de la etapa de blanqueado o decoloración, como mediante la desodorización a bajas temperaturas. Las clorofilas son promotoras muy activas de la fotooxidación. Estos pigmentos verdosos deben ser por tanto retirados de los aceites lo máximo posible mediante el blanqueado para prevenir la degradación de los alimentos por fotooxidación. El escualeno y los esteroides poseen un efecto reducido sobre la oxidación lipídica, pero algunos tipos de esteroides parecen presentar un efecto protector por inhibición de la polimerización de aceites durante la fritura (Frankel, 2005c).

Como ya ha sido mencionado, las grasas y los aceites son ingredientes fundamentales en la dieta humana tanto por su aporte nutricional, como por sus características organolépticas. Además, las grasas y los aceites desempeñan un papel fundamental en el desarrollo de los productos alimenticios procesados ya que influyen en los aspectos físicos, químicos y biológicos de los alimentos. Estos ingredientes son bastante estables en el tiempo si se almacenan bajo condiciones controladas. En otras palabras, su degradación se produce lentamente durante su "vida útil". Sin embargo, diferentes factores pueden afectar considerablemente la estabilidad de estos ingredientes. En los estados más avanzados de degradación, las grasas y aceites desarrollan tanto olores y sabores desagradables, como cambios indeseables en su calidad, pudiendo verse afectado también su valor nutricional (Tena, Lobo-Prieto, Aparicio, & García-González, 2019). Por este motivo, comprender la vida útil de los aceites es un gran foco de interés para la industria alimentaria, ya que la vida útil de los aceites podría influir en la vida útil del producto que los contiene. En el caso de los aceites, es más acertado hablar de "estabilidad" que de "vida útil". La estabilidad es un término relativo que define la estabilidad oxidativa de un aceite en relación con otros aceites. Sin embargo, la mera comparación de la estabilidad oxidativa de los diferentes aceites no proporciona una imagen completa de cómo se comportarán estos aceites en términos de impacto sobre la calidad y vida útil de los productos alimenticios acabados (Syed, 2016).

Es necesario comprender los mecanismos que producen la oxidación lipídica para poder comprender los mecanismos de acción con que estas sustancias ejercen su función antioxidante.

## I.2. DETERIORO QUÍMICO DE LOS LÍPIDOS: REACCIONES OXIDATIVAS

La peroxidación lipídica se define como el deterioro oxidativo de los lípidos (grasas, aceites) a través de la formación de peróxidos. La reacción de estos compuestos con el hidrógeno origina la formación de hidroperóxidos, también llamados productos primarios de oxidación. A partir de estos, suceden una variedad de reacciones secundarias que dan lugar a los productos secundarios de oxidación, que son aldehídos, cetonas, ácidos y otros compuestos de bajo peso

molecular. Este proceso tiene como resultado final la disminución de la calidad del sabor y del color, que hace que los alimentos tengan un aspecto poco apetecible, y la acumulación de productos tóxicos de reacción, lo que plantea un problema importante para la industria alimentaria.

La velocidad de oxidación depende del grado de insaturación y aumenta con el aumento del número de dobles enlaces de los ácidos grasos. Cuando el oxígeno reacciona con los lípidos insaturados, se genera una gran variedad de productos de oxidación (Kerrihard, Pegg, Sarkar, & Craft, 2015). Estos productos derivados de la oxidación lipídica tienen propiedades mutagénicas, carcinogénicas y citotóxicas y se consideran factores de riesgo para la salud humana (Keller *et al.*, 2015). La oxidación de los ácidos grasos de cadena larga también se ha relacionado con la causa de enfermedades neuromiopáticas tanto en bebés como en adultos (Olpin, 2005). Además de la repercusiones sobre la salud, la oxidación de los lípidos reduce la vida útil de muchos productos alimenticios complejos y el valor nutritivo de los alimentos al limitar el contenido de ácidos grasos poliinsaturados esenciales (Böttcher, Steinhäuser, & Drusch, 2015; Li *et al.*, 2015).

El proceso de oxidación lipídica es un fenómeno complejo y todavía se están llevando a cabo muchas investigaciones. Se han identificado tres tipos de oxidación: autooxidación, fotooxidación y oxidación enzimática. La autooxidación ocurre en presencia de oxígeno, resultando en una reacción en cadena autocatalítica que procede a través de intermediarios de radicales. La fotooxidación y la oxidación enzimática son impulsadas por la exposición a la luz y a las enzimas libres respectivamente (Frankel, 2005). En esta memoria se hará hincapié en las reacciones de autooxidación en las que los aceites tienen acceso al oxígeno durante el almacenamiento.

### **I.2.1. Mecanismos de oxidación lipídica**

Se han realizado muchas investigaciones para comprender los procesos de autooxidación de los lípidos, los efectos de los productos de descomposición y la acción de los antioxidantes. Desafortunadamente, los complejos mecanismos de oxidación aún no están claros. La base de las reacciones de oxidación son las especies moleculares conocidas como radicales libres. Los radicales libres son

moléculas o átomos que tiene electrones desapareados. Estas especies pueden variar mucho en su energía. Radicales como el hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ) poseen muy alta energía y pueden oxidar prácticamente a cualquier molécula mediante la sustracción de hidrógeno. Otras moléculas, como el antioxidante  $\alpha$ -tocoferol, forman radicales libres de baja energía, menos capaces de atacar moléculas como ácidos grasos libres (Frankel, 2005b; Min & Boff, 2002).

Frecuentemente, la cinética de la oxidación lipídica de los alimentos muestra una fase de inducción seguida de un incremento exponencial de su velocidad. La duración de esta inducción es muy importante para los fabricantes de alimentos dado que en este periodo la rancidez no se detecta y la calidad del alimento es elevada. Una vez se alcanza la fase exponencial, la oxidación lipídica transcurre rápidamente y se desarrollan olores indeseables en poco tiempo. La duración de la fase de inducción aumenta cuando disminuye la temperatura, la concentración de oxígeno, el grado de insaturación de los ácidos grasos, la actividad de prooxidantes y con el aumento de la concentración de antioxidantes (Huang, Frankel, & German, 1994).

La oxidación puede darse tanto en ácidos grasos libres como en grupos acilo grasos. La ruta de la oxidación de FA comprende tres pasos generales: iniciación, propagación y terminación.

#### *1.2.1.1. Iniciación*

Esta etapa comienza con la sustracción de un hidrógeno de un FA para formar un radical de FA conocido como radical alquilo ( $\text{L}\cdot$ ). Una vez formado, el radical libre se estabiliza por deslocalización a través del o de los dobles enlaces, dando como resultado un doble enlace móvil, que en el caso de los ácidos grasos poliinsaturados conduce a la formación de dobles enlaces conjugados. Esta movilidad en la posición puede producir enlaces dobles en cualquiera de las configuraciones *cis* o *trans*, predominando esta última a causa de su mayor estabilidad (McClements & Decker, 2010). La Figura I.6 muestra la etapa de iniciación con la sustracción de un hidrógeno del carbono metilénico del ácido linoleico, la consecuente reorganización del doble enlace y producción de dos isómeros.

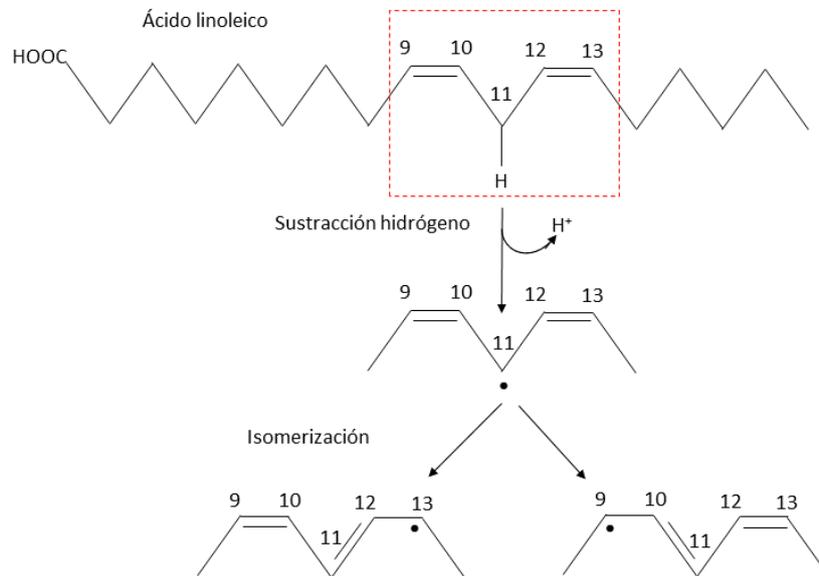


Figura I.6. Etapa de iniciación de la oxidación lipídica del ácido linoleico. Imagen modificada. Fuente imagen: McClements & Decker, 2010.

La facilidad de formación de radicales ácido graso aumenta cuando lo hace la insaturación. La energía de disociación del enlace covalente carbono-hidrógeno en una cadena alifática es  $98 \text{ Kcal mol}^{-1}$ . Si el átomo de carbono es adyacente a un doble enlace, la unión carbono-hidrógeno se debilita, disminuyendo la energía de disociación a  $89 \text{ Kcal mol}^{-1}$ . En los ácidos grasos poliinsaturados los dobles enlaces están en una configuración tipo pentadieno con un carbono metilénico. Dado que el enlace covalente carbono-hidrógeno de este último carbono está debilitado por dos dobles enlaces, su energía de disociación es aún más baja,  $80 \text{ Kcal mol}^{-1}$ . Conforme desciende la energía de disociación del enlace carbono-hidrógeno, la separación del hidrógeno es más fácil y la oxidación lipídica más rápida. Se estima que el ácido linoleico (18:2) es unas 10-40 veces más susceptible a la oxidación que el oleico (18:1). A medida que aumenta el número de dobles enlaces en los ácidos grasos poliinsaturados crece también el número de carbonos metilénicos y, con ellos, las posiciones desde las que puede sustraerse hidrógeno. Por ejemplo, el ácido linoleico (18:2) tiene un carbono metilénico, en tanto que el linolénico (18:3) tiene 2 y el araquidónico (20:4) tiene 3. En la mayor parte de los casos las

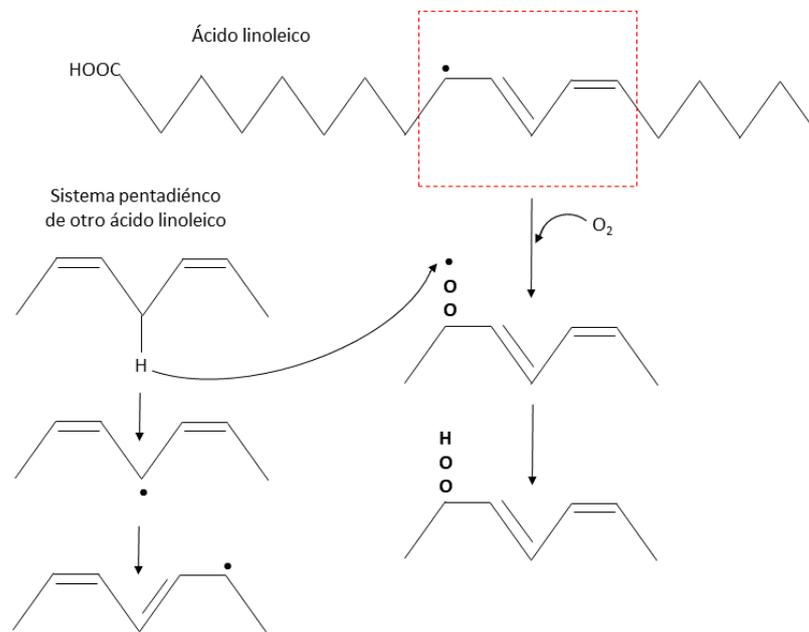
velocidades de oxidación se doblan por cada carbono metilénico adicional. Así, el linolénico se oxida dos veces más rápido que el linoleico y el araquidónico dos veces más rápido que el linolénico (4 veces más rápido que el linoleico)(Min & Boff, 2002).

#### *1.2.1.2. Propagación*

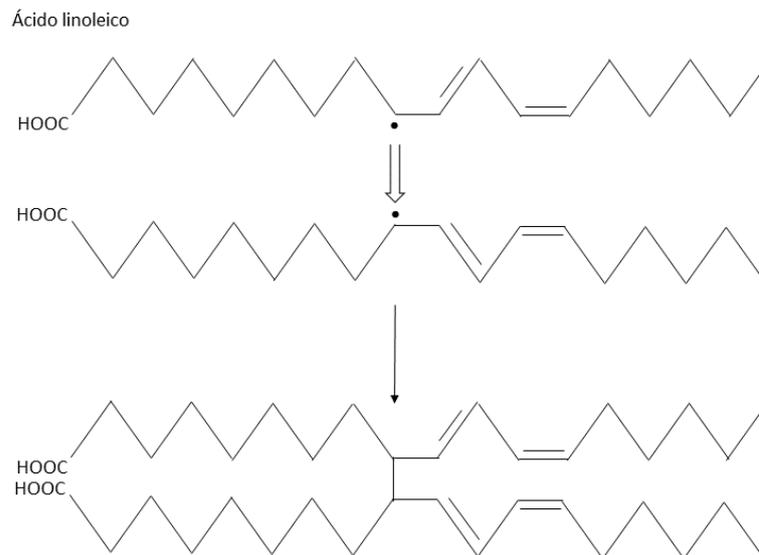
El primer paso de la propagación consiste en la adición de oxígeno al radical alquílico. El oxígeno atmosférico o triplete es un birradical porque contiene dos electrones en la misma dirección de spin que no pueden coexistir en el mismo orbital. Los radicales libres del oxígeno triplete son de baja energía y no originan directamente una sustracción de hidrógeno. No obstante, estos radicales del oxígeno pueden reaccionar con los radicales alquilo a una velocidad limitada. La combinación de un radical alquilo con uno de los electrones del oxígeno triplete da como resultado la formación de un enlace covalente. El otro electrón del oxígeno queda libre. El radical resultante se conoce como radical peroxilo ( $\text{LOO}^{\bullet}$ ). La alta energía de estos radicales les permite promover la sustracción de hidrógeno de otra molécula. Puesto que el enlace carbono-hidrógeno de los ácidos grasos insaturados es débil, es susceptible de ser atacado por los radicales peroxilo. La adición de hidrógeno a un radical peroxilo da como resultado la formación de un hidroperóxido de ácido graso. De esta forma, la reacción se propaga de un ácido graso a otro(Frankel, 1996; McClements & Decker, 2010). Un esquema de esta ruta para dos moléculas de ácido linoleico se muestra en la Figura I.7.

#### *1.2.1.3. Terminación*

Esta reacción comprende la combinación de dos radicales para formar especies no radicalarias. En presencia de oxígeno, el radical libre dominante es el peroxilo, ya que el oxígeno se adicionará a los alquilo a velocidades de difusión limitadas. De este modo, bajo condiciones atmosféricas, las reacciones de terminación pueden darse entre radicales peroxilo y alcoxilo. En ambiente con bajo oxígeno (por ejemplo, aceite de freír), estas reacciones de terminación ocurren entre radicales alquilo, formando dímero de ácidos grasos (Figura I.8). Los polímeros de ácidos grasos se han usado como indicio de la calidad de los aceites de fritura (Abidi & Rennick, 2003).



**Figura I.7.** Etapa de propagación de la oxidación lipídica del ácido linoleico. Imagen modificada. Fuente imagen: McClements & Decker, 2010).



**Figura I.8.** Ejemplo de etapa de terminación de la oxidación lipídica del ácido linoleico. Imagen modificada. Fuente imagen: McClements & Decker, 2010.

### **I.2.2. Formación de productos de descomposición de la oxidación lipídica**

Una vez los hidroperóxidos lipídicos se han descompuesto en radicales alcoxilo, pueden desarrollarse varios esquemas de reacción diferentes. Los productos de estas reacciones dependerán del tipo de ácido graso, así como de la posición del hidroperóxido en el mismo. Adicionalmente, los productos de descomposición pueden ser insaturados y tener intactas las estructuras pentadiénicas, lo que significa que estos productos pueden oxidarse más. Dado que el tipo de estos productos dependerá de la composición en ácidos grasos del alimento, la oxidación lipídica puede tener efectos distintos sobre las propiedades sensoriales.

Una de las razones por las que la descomposición de hidroperóxidos lipídicos conduce a la escisión de las cadenas alifáticas de los ácidos grasos es la formación de radicales alcoxilo ( $LO^{\bullet}$ ). Este radical es de mayor energía que los alquilo ( $L^{\bullet}$ ) y peroxilo ( $LOO^{\bullet}$ ). Así, un radical alcoxilo tiene bastante energía para sustraer un electrón de los enlaces covalentes adyacentes a la posición donde se encuentra, originando la escisión de la cadena alifática del ácido graso. Esta reacción, conocida como  $\beta$ -escisión, es importante para la calidad alimentaria, ya que da lugar a la formación de compuestos de bajo peso molecular que se perciben como rancidez (McClements & Decker, 2010).

#### *I.2.2.1. Reacción de $\beta$ -escisión*

La descomposición de hidroperóxidos lipídicos en radicales alcoxilo ( $LO^{\bullet}$ ) se acompaña generalmente por una reacción de  $\beta$ -escisión. Esta reacción escinde la cadena alifática del ácido graso produciendo aldehídos y un radical de cadena (por ejemplo, un radical alquilo).

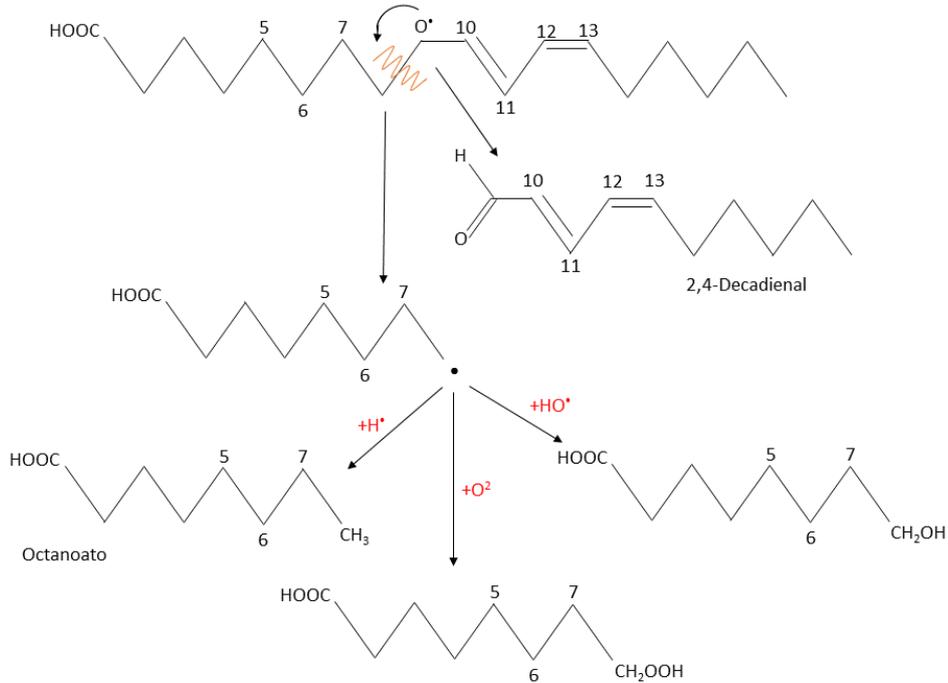


Figura I.9. Posibles rutas de reacción de un radical libre lipídico producido por β-escisión. Imagen modificada. Fuente imagen: (Frankel, 2005b).

El radical alquilo reacciona a continuación con un radical hidrógeno formando un hidrocarburo, con un radical hidroxilo para formar un alcohol, o con un oxígeno dando un hidroperóxido. En la Figura I.9. se muestran ejemplos de estas reacciones (Frankel, 2005). Puesto que el hidroperóxido puede formarse en numerosas posiciones de la cadena de los ácidos insaturados, se originan un gran número de productos diferentes procedentes de las reacciones de β-escisión. Se debe recordar que el producto de descomposición de un ácido graso usualmente estaría esterificado, a través de su carboxilo, al glicerol de un triaciglicerol o fosfolípido. Por ello, este producto de descomposición no sería volátil y no contribuiría a la rancidez, a menos que sufra reacciones de descomposición adicionales que formen compuestos de bajo peso molecular.

### I.3. ANTIOXIDANTES

En ambiente oxigenado, la presión oxidativa existe en todos los organismos. Por ello, los sistemas biológicos han desarrollado varias defensas antioxidantes para protegerse de la oxidación. No hay una definición uniforme de antioxidante porque existen numerosos mecanismos químicos mediante los que puede inhibirse la oxidación. Los tejidos biológicos a partir de los que se obtienen los alimentos contienen generalmente varios sistemas antioxidantes endógenos. Desafortunadamente, las operaciones de procesado alimentario pueden eliminar antioxidantes o causar una presión oxidativa que sobrepase su capacidad. Por ello, es habitual incorporar una protección adicional antioxidante en los alimentos procesados. Los mecanismos antioxidantes de los compuestos que se usan para aumentar la estabilidad oxidativa de los alimentos incluyen el control de radicales libres, prooxidantes y productos intermedios de oxidación. Basados en su actividad, los antioxidantes lipídicos se clasifican como antioxidantes capaces de interrumpir la cadena de reacciones de autooxidación, o antioxidantes primarios, y sinérgicos o antioxidantes secundarios.

Los antioxidantes primarios son principalmente compuestos que retardan la oxidación lipídica mediante la captación de radicales libres, inhibiendo así reacciones de iniciación, propagación y  $\beta$ -escisión. Los compuestos que retardan la oxidación lipídica generalmente con mecanismos distintos a los de la captación de radicales libres (como la quelación de metales, la extinción de oxígeno singlete, etc.) se denominan antioxidantes secundarios (M.H. Gordon, 1990). Algunos de ellos se denominan a menudo sinérgicos (por ejemplo, ácido cítrico, ácido ascórbico, lecitina, etc.) debido a su capacidad para promover la acción de los antioxidantes primarios (Minotti, 1993; Reische, Lillard, & Eitenmiller, 2002).

Los compuestos captadores de radicales libres (FRS), o antioxidantes primarios, interaccionan con radicales peroxilo ( $\text{LOO}^{\bullet}$ ) y alcoxilo ( $\text{LO}^{\bullet}$ ) siguiendo la siguiente reacción:



Estos compuestos inhiben la oxidación lipídica reaccionando más rápidamente con los radicales libres que los ácidos grasos insaturados. Se piensa que los FRS interaccionan principalmente con los radicales peroxilo a causa de su menor energía y mayor tiempo de vida (porque son menos reactivos). Teniendo por ello una mayor probabilidad de reaccionar con el hidrógeno de baja energía del FRS. Contrariamente, los radicales libres de alta energía (por ejemplo, el  $\cdot\text{OH}$ ) son tan reactivos que interaccionan con las moléculas más próximas a su lugar de producción. Puesto que los FRS están en bajas concentraciones, su reacción con radicales de alta energía sería menos probable (Liebler, 1993).

La eficacia antioxidante depende de la capacidad de donación de hidrógeno del FRS a un radical libre. A medida que disminuye la energía del enlace de un hidrógeno en un FRS es más favorable energéticamente su transferencia a un radical libre, y por ello más rápida. Esta capacidad de transferencia puede predecirse con la ayuda de los potenciales estándar de reducción (Buettner, 1993). Cualquier compuesto que tenga un potencial de reducción menor que el correspondiente a un radical libre (o especie oxidada) es capaz de donarle su hidrógeno, a menos que la reacción sea inviable cinéticamente. Por ejemplo, los FRS  $\alpha$ -tocoferol ( $E^{\circ'}=530$  mV), catecol ( $E^{\circ'}=500$  mV) y ascorbato ( $E^{\circ'}=282$  mV) tienen potenciales de reducción inferiores al radical peroxilo ( $E^{\circ'}=1000$  mV), por lo que pueden transformar un hidrógeno para formar un hidroperóxido.

La eficacia de los FRS depende así mismo de la energía de su radical libre (FRS $\cdot$ ). Si este es de baja energía, la probabilidad de que catalice la oxidación de un ácido graso insaturado disminuye. Un FRS eficaz forma radicales de baja energía a causa de la deslocalización por resonancia (Figura I.10). Así mismo, una FRS eficaz, produce radicales que no reaccionan rápidamente con oxígeno para formar hidroperóxidos. Si así lo hiciera, sufriría reacciones de descomposición que podrían originar la oxidación de ácidos grasos insaturados.

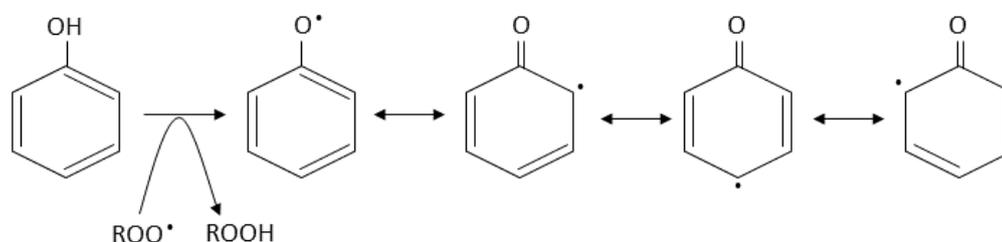


Figura I.10. Deslocalización por resonancia del radical fenol. Imagen modificada.

Fuente imagen: Shahidi, Janitha, & Wanasundara, 1992.

Los radicales FRS<sup>•</sup> toman parte en reacciones de terminación con otro FRS<sup>•</sup> o radicales lipídicos, formando especies no radicales. Esto significa que cada FRS es capaz de inactivar, al menos, dos radicales libres, el primero cuando interacciona con radicales peróxido o alcóxido, y el segundo cuando el FRS<sup>•</sup> se inactiva en reacciones de terminación. (Figura I.11).

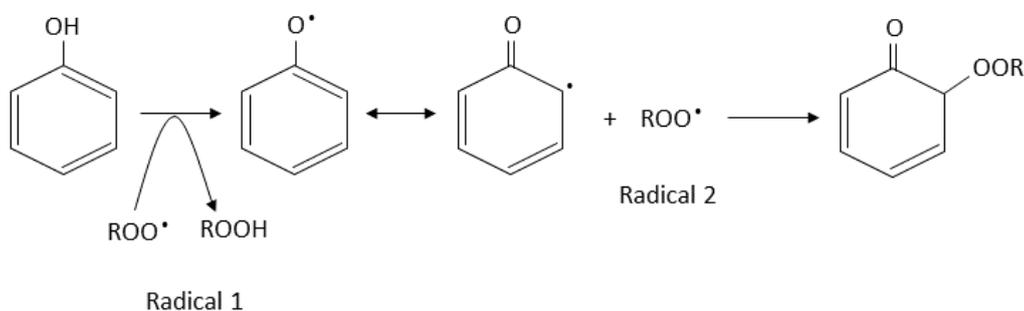


Figura I.11. Reacción de terminación entre un radical antioxidante y un radical peróxido lipídico (ROO<sup>•</sup>). Imagen modificada. Fuente imagen: McClements & Decker, 2010.

Los compuestos fenólicos poseen muchas de las propiedades de un FRS eficiente. Estos compuestos donan un hidrógeno de sus grupos hidroxilo, originando un radical fenólico de baja energía como consecuencia de la deslocalización electrónica por toda la estructura de anillo fenólico. De este modo son capaces de inhibir la iniciación de la autooxidación o de interrumpir la etapa de propagación de la oxidación lipídica, con la consecuente reducción en la formación de productos volátiles de descomposición (p. ej. aldehídos y cetonas)

que causan la rancidez. La eficacia de los fenoles FRS puede aumentar gracias a la presencia de grupos sustituyentes en el anillo, que incrementan la capacidad de donación de hidrógeno a los radicales lipídicos y/o por aumento de la estabilidad del FRS<sup>\*</sup> (Shahidi *et al.*, 1992).

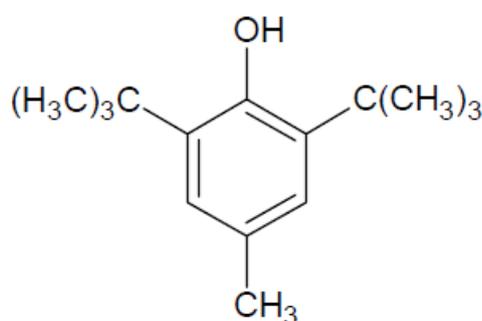
Los antioxidantes para uso alimentario deben ser económicos, no tóxicos y efectivos a bajas concentraciones. Además, deben ser altamente estables y capaces de conservar su actividad tras el procesado de los alimentos. Por último, los antioxidantes alimentarios deben ser inodoros, incoloros y no aportar sabor a los alimentos, así como presentar una fácil incorporación y buena solubilidad en ellos (Kiokias, Varzakas, & Oreopoulou, 2008).

### **I.3.1. Antioxidantes de origen sintético**

El fenol no es en sí un buen antioxidante, pero la adición de sustituyentes en el anillo mejora su actividad. Por ello, la mayoría de los antioxidantes sintéticos son compuestos monofenólicos sustituidos. Algunos de los FRS usados más comúnmente en los alimentos son los fenoles butilhidroxitolueno, butilhidroxianisol y *terc*-butilhidroquinona, y el ácido ascórbico o su forma esterificada con el ácido palmítico, el palmitato de ascorbilo. Al igual que en otros FRS, las interacciones entre antioxidantes sintéticos y radicales lipídicos dan lugar a la formación de radicales fenólicos de baja energía estabilizados por resonancia. Esta baja energía impide que catalicen rápidamente la oxidación de los ácidos grasos insaturados. Además, los radicales antioxidantes sintéticos no reaccionan fácilmente con oxígeno para formar hidroperóxidos antioxidantes inestables, los cuales se descomponen en radicales libres de alta energía que favorecen la oxidación. En lugar de ello tienden a dar reacciones de terminación radical-radical. Los antioxidantes sintéticos son eficaces en numerosos sistemas alimentarios, aunque su uso en la industria alimentaria ha disminuido recientemente por la aparición de ciertas controversias en torno a su seguridad y demanda de productos naturales por parte del consumidor (Pop *et al.*, 2016).

### *1.3.1.1. Butilhidroxitolueno*

El butilhidroxitolueno (BHT), conocido como aditivo E-321, es un antioxidante sintético con la fórmula  $C_{15}H_{24}O$ . Tiene un peso molecular de 220,36 g/mol; el número de registro CAS (Chemical Abstracts Service) es 128-37-0 y el número EINECS (European Inventory of Existing Commercial chemical Substances) es 204-881-4. El nombre químico es 2,6-di-*terc*-butil-4-metilfenol. Su estructura molecular es presentada en la Figura I.12.



**Figura I.12.** Estructura molecular del BHT.

El BHT es un sólido blanco, cristalino, inodoro o ligeramente aromático. Es insoluble en agua y fácilmente soluble en etanol y aceites grasos. Se sintetiza a través de un proceso de varias etapas mediante la reacción de *p*-cresol (4-metilfenol) y el isobutileno de alta pureza (2-metilpropano) utilizando un catalizador ácido. Después de la neutralización por adición de carbonato de sodio, y la cristalización, filtrado y lavado con isopropanol, la sustancia obtenida se seca y se tamiza para obtener el producto final (EFSA ANS Panel, 2016). La pureza del producto final debe ser igual o superior al 99% («Directiva 95/2/CE del Parlamento Europeo y del Consejo», 1995).

El BHT es un aditivo generalmente reconocido como seguro (GRAS) autorizado para su uso en grasas y aceites, únicamente para la fabricación profesional de alimentos tratados térmicamente, en aceite de fritura y grasa para freír (excluido el aceite de orujo de oliva) y en manteca de cerdo, aceite de pescado, carne de vacuno, aves y grasa de oveja. Se permite solo o en combinación con otros

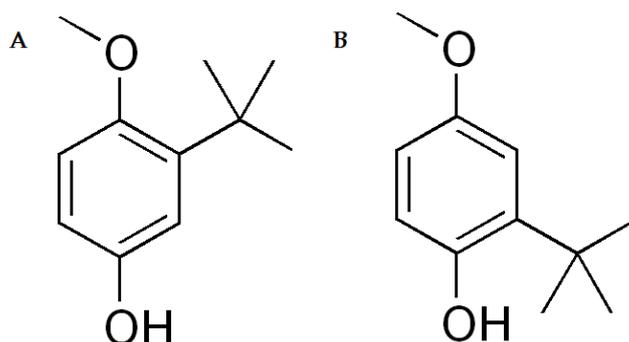
antioxidantes como galatos, *terc*-butilhidroquinona y butilhidroxianisol en cantidades de hasta 100 mg/Kg expresados en grasa. Además, se permite el uso de BHT en goma de mascar sola o en combinación con los antioxidantes antes mencionados con un nivel máximo permitido (MLP) de 400 mg/Kg de goma de mascar («Reglamento (CE) N o 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo», 2008).

El BHT posee propiedades similares a las del butilhidroxianisol pero, aunque es apropiado para el tratamiento térmico, no es tan estable (Hussain *et al.*, 2003). Ha sido ampliamente utilizado en las industrias de fabricación y procesamiento de plásticos, en la fermentación y en la bioquímica industrial. Además, el BHT puede utilizarse como aditivo en aceites esenciales y cosméticos. Ha sido uno de los antioxidantes más utilizados en los alimentos que contienen grasas, productos derivados del petróleo y caucho (Yehye *et al.*, 2015). Debido a su amplia difusión como conservante alimentario, las propiedades bioquímicas del BHT han sido ampliamente estudiadas. Se ha reportado que el BHT a dosis elevadas produce necrosis centrilobular, aumento de la actividad de la transaminasa sérica, y hemorragia en el hígado. También se ha descrito que el BHT aumenta la actividad mitótica de los hepatocitos en ratas y gatos actuando como promotor de la hepatocarcinogénesis (Furukawa *et al.*, 2001; Powell, Connelly, Jones, Grasso, & Bridges, 1986). Otros estudios han sugerido el potencial efecto del BHT como disruptor endocrino en ratas hembras preadolescentes (Pop *et al.*, 2016). A pesar de que los resultados de los estudios sobre los efectos perjudiciales del BHT sobre la salud en animales de experimentación son todavía controvertidos, este antioxidante sigue siendo uno de los más utilizados en la industria alimentaria (Dolatabadi & Kashanian, 2010). El BHT también es ampliamente utilizado en combinación con otros antioxidantes como BHA, galato de propilo y ácido cítrico para la estabilización de aceites y alimentos ricos en grasas. Además, BHT y BHA pueden ser utilizados como co-antioxidantes por la regeneración del  $\alpha$ -tocoferol (Mukhopadhyay, 2006).

#### *1.3.1.2. Butilhidroxianisol*

El butilhidroxianisol (BHA), conocido como aditivo E-320, es un antioxidante sintético con la fórmula molecular  $C_{11}H_{16}O_2$ . Tiene un peso molecular de 180,25

g/mol, un número de registro CAS 25013-16-5 y un número EINECS 246-563-8. El BHA es una mezcla de dos isómeros cuyos nombres químicos completos son: 2-*tert*-butil-4-hidroxianisol y 3-*tert*-butil-4-hidroxianisol. Su estructura molecular es presentada en la Figura I.13.



**Figura I.13.** Estructura molecular de los isómeros de BHA: (A) 2-*tert*-butil-4-hidroxianisol y (B) 3-*tert*-butil-4-hidroxianisol.

El BHA es un sólido cristalino blanco o ligeramente amarillo con un ligero olor característico. Es insoluble en agua, fácilmente soluble en etanol, otros alcoholes, propilenglicol, éter de petróleo y grasas y aceites. Se sintetiza a partir de la reacción química entre el *p*-metoxifenol y el isobuteno a 150°C utilizando una solución de óxido de aluminio o de sílice como catalizador. La metilación de la hidroquinona produce un producto intermedio que da lugar a una mezcla de 2-*tert*-butil-4-hidroxianisol y 3-*tert*-butil-4-hidroxianisol en el tratamiento con alcohol *tert*-butilo y ácido fosfórico. La pureza del producto final debe no inferior al 98,5% para el 2-*tert*-butil-4-hidroxianisol y no inferior al 85% para el 3-*tert*-butil-4-hidroxianisol («Directiva 2008/84/CE del Parlamento Europeo y del Consejo», 2008).

El BHA es un antioxidante sintético autorizado en la UE («Directiva 95/2/CE», 1995) solo o en combinación con otros antioxidantes como los galatos, *tert*-butilhidroquinona y el bitilhidroxitolueno, con un MPL que oscila entre 25 y

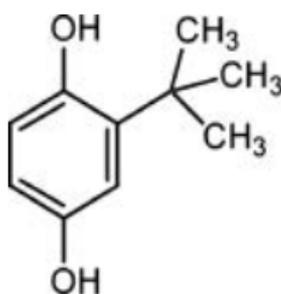
400 mg/Kg en 7 categorías de alimentos enumeradas en los anexos II y III del Reglamento (CE) no 1333/2008. No está autorizado para su uso en bebidas.

El BHA es estable en presencia de calor y en condiciones ligeramente alcalinas, lo que hace que este aditivo sea particularmente adecuado para alimentos horneados y fritos (Emerton & Choi, 2008). El BHA es altamente soluble en grasas animales y estable bajo las condiciones de muchas de las operaciones de procesamiento de alimentos. Se utiliza para inhibir la formación de radicales libres y prevenir así el deterioro de los alimentos por oxidación lipídica, en particular de los productos fritos (Aksu & Kaya, 2005; dos Santos Raymundo, Marques da Silva Paula, Franco, & Fett, 2007). También se utiliza como conservante en cereales secos, productos a base de patata y bebidas y postres elaborados a partir de preparados secos en polvo.

El BHA ha mostrado efecto protector contra el envenenamiento por radiación en animales, así como contra la intoxicación aguda por sustancias xenobióticas y mutagénicas (Yu, Tan, & Kong, 1997). Sin embargo, también se ha documentado que el BHA actúa como un iniciador o activador de tumores en algunos tejidos animales. Por ejemplo, se ha observado que, el BHA induce la formación de papiloma y carcinoma en el estómago de ratas, ratones y hámsteres cuando son alimentados de manera continua con altas concentraciones de este aditivo. También ha sido descrito el papel de BHA en la inducción de efectos proliferativos en el esófago de cerdos y primates (Botterweck, Verhagen, Goldbohm, Kleinjans, & van den Brandt, 2000; Yu *et al.*, 1997). Un metabolito importante del BHA, la *terc*-butilhidroquinona, ha sido también considerado como cancerígeno (Nagai, Okubo, Ushiyama, Satoh, & Kano, 1996). Aunque ambos efectos, cancerígenos y anticancerígenos, del BHA han sido bien descritos, los mecanismos precisos de cómo consiguen estos efectos permanecen aún poco claros, pero probablemente dependen de la dosis y/o del tejido (Yu *et al.*, 1997).

### I.3.1.3. *Terc-butilhidroquinona*

La *terc*-butilhidroquinona (TBHQ), conocida como aditivo E-319, es un antioxidante sintético con la fórmula molecular  $C_{10}H_{14}O_2$ . Tiene un peso molecular de 166,22 g/mol, un número de registro CAS 1948-33-0 y un número EINECS 217-752-2. El nombre químico es 2-(1,1-Dimetil Etil)-1,4-bencenodiol y su estructura molecular es presentada en la Figura I.14.



**Figura I.14.** Estructura molecular del TBHQ

El TBHQ es un fenol orgánico aromático que se sintetiza químicamente. Se deriva de la hidroquinona, sustituido por un grupo *terc*-butilico. Se trata de un antioxidante sólido que es fácilmente soluble en grasas y aceites y en una serie de disolventes de grado alimentario, pero es prácticamente insoluble en agua. La pureza del producto final no debe ser inferior al 99% («Directiva 2008/84/CE del Parlamento Europeo y del Consejo», 2008).

El TBHQ es un antioxidante sintético autorizado como aditivo alimentario en la UE de acuerdo con Reglamento (CE) No 1333/2008 sobre aditivos alimentarios («Reglamento (CE) N o 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo», 2008) solo o en combinación con otros antioxidantes como los galatos, butilhidroxianisol e butilhidroxitolueno, con un MPL que oscila entre 25 y 400 mg/Kg en 18 categorías de alimentos enumeradas en los anexos II y III del Reglamento (CE) no 1333/2008.

El TBHQ es efectivo en la estabilización de aceites altamente insaturados, grasas animales y productos cárnicos comestibles. Este aditivo ofrece un buen rendimiento en cuanto a su actividad protectora contra el deterioro oxidativo sobre

los productos fritos (aunque no es efectivo para aplicaciones en alimentos horneados) (Emerton & Choi, 2008). No causa decoloración ni siquiera en la presencia de hierro, y no altera el sabor ni el olor de los productos alimentarios a los que se añade. El TBHQ se sintetiza a partir del BHA por O-demetilación (T Okubo, Yokoyama, Kano, & Kano, 2003).

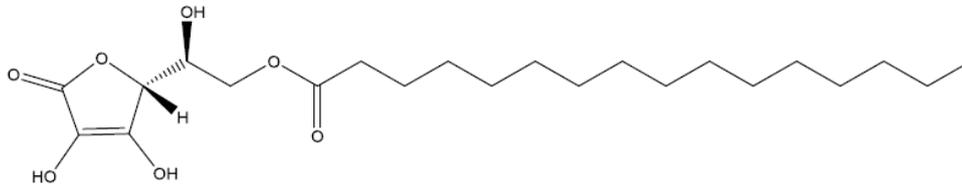
A dosis altas, este aditivo alimentario ha mostrado algunos efectos negativos sobre la salud en animales de laboratorio, actuando como precursores de tumores estomacales y el daño del ADN (Okubo *et al.*, 2003). Varios estudios han evidenciado que el TBHQ causa la fragmentación del ADN *in vitro* (Tomoko Okubo, Nagai, Ushiyama, & Kano, 1997) y la formación de 8-hidroxideoxiguanosina en el ADN de terneros debido a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) tales como el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno (Nagai *et al.*, 1996).

#### *1.3.1.4. Palmitato de ascorbilo*

El ácido L-Ascórbico (vitamina C) es un antioxidante natural, pero su naturaleza altamente polar dificulta su utilización en grasas y aceites. El proceso de conversión del ácido ascórbico en sus ésteres ácidos se ha considerado una solución eficaz para superar esta problemática.

Los ésteres de ascorbilo son aditivos alimentarios emergentes en la industria farmacéutica y cosmética. Debido a que son moléculas anfipáticas que poseen una alta capacidad de captación de radicales libres, se pueden aplicar tanto como antioxidantes liposolubles, así como emulgentes y biosurfactantes (Stojanović *et al.*, 2015).

El palmitato de ascorbilo (AP), conocido como aditivo E-304i, es un antioxidante sintético con la fórmula molecular  $C_{22}H_{38}O_7$ . Tiene un peso molecular de 414,55 g/mol (del cual el 42% corresponde a la fracción del ácido ascórbico), un número de registro CAS 137-66-6 y un número EINECS 205-305-4. El nombre químico es [(2S)-2-[(2R)-4,5-Dihidroxi-3-oxo-2-furil]-2-hidroxi-ethyl] hexadecanoato y su estructura molecular es presentada en la Figura I.15.



**Figura I.15.** Estructura molecular del AP

El AP es un polvo blanco o blanco amarillento con un olor parecido al de los cítricos, muy ligeramente soluble en agua y muy soluble en etanol. Se sintetiza de acuerdo con las Buenas Prácticas de Fabricación (BPF) vigentes mediante la esterificación del ácido ascórbico con ácido palmítico en presencia de ácido sulfúrico como catalizador y a una temperatura ligeramente elevada (EFSA, 2015a). La pureza del producto final no debe ser inferior al 98% (Diario Oficial de la Unión Europea, 2012).

Actualmente, los ésteres de ácidos grasos de ácido ascórbico son aditivos alimentarios autorizados en la UE, en su mayoría según *Quantum Satis (QS)*, excepto en el caso de los alimentos para lactantes y niños de corta edad donde el MLP oscila entre 10 y 100 ppm en 16 categorías de alimentos enumeradas en los anexos II y III del Reglamento (CE) no 1333/2008.

El AP es una molécula anfipática que tiene una cabeza anhidra (polar) y una cola hidrofóbica (polar), por lo que es lipofílico y soluble en agua a la vez. Debido a esta naturaleza, el AP es preferido sobre el ácido ascórbico como ingrediente alimentario. El AP se utiliza como antioxidante y conservante en alimentos, vitaminas, medicamentos y cosméticos (Wawire *et al.*, 2011). También se utiliza para retardar la oxidación lipídica en PUFA (Jacobsen, 2010).

En un estudio *in vitro* sobre la hidrólisis del AP a través de un proceso de digestión intestinal simulado, los autores concluyeron que el AP fue hidrolizado rápida y completamente en ácido ascórbico y ácido palmítico y que puede esperarse que se produzca un comportamiento similar en el intestino (Beck, Bruchlen, Schäfer, & Mair, 2014).

### I.3.2. Antioxidantes de origen natural

Los antioxidantes sintéticos han sido ampliamente utilizados en las últimas décadas para retardar la degradación oxidativa de los lípidos debido a su alta estabilidad oxidativa y bajo coste. Se ha demostrado que los antioxidantes sintéticos pueden compartir una serie de propiedades tóxicas, mutagénicas, teratogénicas y cancerígenas a altas concentraciones (Shahidi, 2005). Por otro lado, algunos estudios han reportado que la dosis de antioxidantes sintéticos que se utilizan actualmente en los alimentos no sólo no tiene ningún efecto adverso en los seres humanos, sino que además tiene propiedades anticancerígenas y antimutagénicas y algunos otros efectos beneficiosos. La seguridad de los antioxidantes continúa siendo hoy una discusión controvertida que ha llevado a una creciente demanda por parte del consumidor de aditivos naturales que sean más compatibles con la naturaleza humana (Pop *et al.*, 2016).

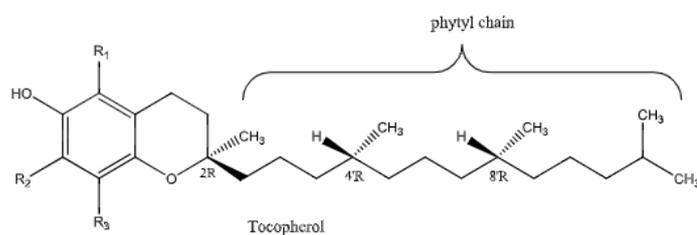
En los últimos años, los compuestos fenólicos de origen vegetal han despertado una considerable atención debido a sus beneficios funcionales y nutricionales, incluidos los efectos antioxidantes y antimicrobianos (Bubonja-Sonje, Giacometti, & Abram, 2011). Con el fin de reducir la aplicación de compuestos de origen sintético, durante las últimas dos décadas se han llevado a cabo muchas investigaciones sobre el uso de extractos vegetales naturales con actividad antioxidante en diversos alimentos.

Los antioxidantes de origen natural más empleados en la industria alimentaria, como alternativa al uso de antioxidantes de origen sintético para inhibir o retardar la oxidación lipídica, son el extracto natural rico en tocoferoles y el extracto de romero.

#### *I.3.2.1. Extracto natural rico en tocoferoles*

Los tocoferoles (vitamina E) son un grupo de compuestos que poseen un anillo hidroxilado o anillo de cromanol y una cadena de fitol. Las diferencias en los distintos homólogos del tocoferol se encuentran en la metilación del anillo de cromanol, estando trimetilado el  $\alpha$ -tocoferol (en las posiciones 5, 7 y 8), dimetilados el  $\beta$ -tocoferol (en las posiciones 5 y 8) y el  $\gamma$ -tocoferol (en las posiciones 7 y 8), y con un solo metilo en posición 8 el  $\delta$ -tocoferol (Figura I.16). Los tocotrienoles se

diferencian de los tocoferoles en que poseen tres dobles enlaces en sus cadenas de fitol en las posiciones 3, 7 y 11. Las reacciones entre tocoferoles y radicales lipídicos peroxilo conducen a la formación de un hidroperóxido lipídico y varias estructuras resonantes de radicales tocoferoxilo. Estos radicales interactúan con otros radicales lipídicos, o uno con otro, formando varios productos de terminación. Generalmente los tocoferoles son insolubles en agua. No obstante, la polaridad es diferente, siendo el  $\alpha$ -tocoferol (trimetilado) el menos polar y el  $\delta$ -tocoferol (monometilado) el más polar (Liebler, 1993).



Compound	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	Stereochemical configuration
d- $\alpha$ -tocopherol	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	2R, 4'R, 8'R
d- $\beta$ -tocopherol	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	2R, 4'R, 8'R
d- $\gamma$ -tocopherol	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	2R, 4'R, 8'R
d- $\delta$ -tocopherol	H	H	CH <sub>3</sub>	2R, 4'R, 8'R

**Figura I.16.** Estructura molecular de los distintos isómeros de tocoferol.

Fuente imagen: (EFSA, 2015b).

El extracto rico en tocoferoles de origen natural (TOC), conocido como aditivo E-306, se define como un "producto obtenido por destilación al vacío por vapor de aceites vegetales comestibles, que contiene tocoferoles y tocotrienoles concentrados". Contiene tocoferoles del tipo d- $\alpha$ , d- $\beta$ -, d- $\gamma$ - y d- $\delta$ -tocoferoles en una concentración no inferior al 34% de tocoferoles totales p/p. TOC posee un aspecto oleoso color rojo pardo, claro y viscoso. Puede mostrar una ligera separación de los constituyentes similares a la cera en forma microcristalina y es insoluble en agua, soluble en etanol y miscible en éter (EFSA, 2015b).

La fuente comercial más importante de tocoferoles proviene del procesamiento de aceites vegetales. El paso de desodorización en el procesamiento del aceite implica

la destilación para eliminar los ácidos grasos libres, en este proceso los tocoferoles son destilados junto a estos ácidos grasos. A continuación, pueden utilizarse varios métodos para extraer los tocoferoles del destilado obtenido, estos incluyen: esterificación, saponificación, destilación, métodos cromatográficos, extracción líquido-líquido, cristalización, métodos enzimáticos y extracción de fluidos supercríticos. Los distintos métodos se utilizan combinados de distintos modos, ya que por sí solos, ningún método es suficiente. El primer paso es la eliminación de los componentes grasos, que constituyen la mayor parte del destilado. Esto se consigue normalmente mediante esterificación y saponificación, seguidas de destilación. Los componentes no saponificables pueden eliminarse mediante métodos cromatográficos, cristalización y destilación molecular. Los componentes individuales como  $\alpha$ -,  $\beta$  ,  $\gamma$ - y  $\delta$ -tocoferol pueden ser aislados utilizando la separación cromatográfica (Quek, Chen, & Baharin, 2007).

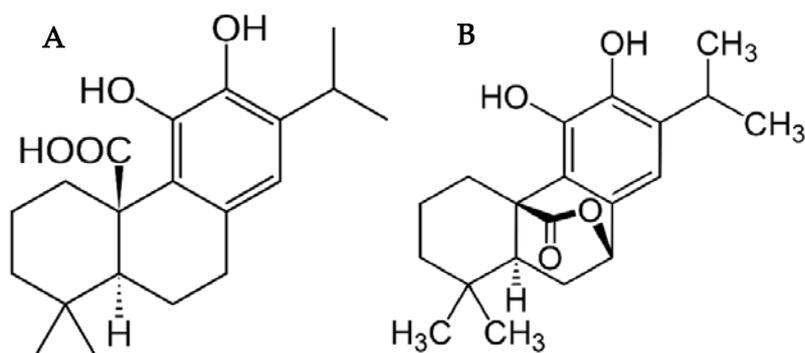
TOC es utilizado como antioxidante en alimentos para inhibir la peroxidación de grasas y lípidos. Estos tocoferoles están autorizados como aditivos alimentarios en la Unión Europea a niveles *QS* en 68 categorías de alimentos, a un MPL de 10-100 mg/Kg en alimentos para lactantes y niños de corta edad (seis categorías de alimentos) y a un nivel de 200 mg/Kg en grasas y aceites esencialmente exentos de agua (sólo aceites de oliva refinados y sólo para  $\alpha$ -tocoferol) de conformidad con el anexo II del Reglamento (CE) no 1333/2008 sobre aditivos alimentarios («Reglamento (CE) N o 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo», 2008).

En base al hecho de que el cuerpo retiene preferentemente el  $\alpha$ -tocoferol, en lugar de cualquiera de las otras formas de tocoferol, y que este isómero es el más activo biológicamente, se asume que el  $\alpha$ -tocoferol es representativo de los otros tocoferoles y que por tanto puede ser considerado como el peor supuesto para el estudio de la posible toxicidad de este compuesto (EFSA, 2015b). Diversos experimentos con animales han demostrado que el  $\alpha$ -tocoferol no tiene propiedades mutagénicas, teratogénicas ni carcinogénicas. Basado en estudios en humanos, una dosis diaria de 100-300 mg de  $\alpha$ -tocoferol puede considerarse inofensiva desde un punto de vista toxicológico. Diversos estudios doble ciego que involucraron a un gran número de sujetos, demostraron que dosis orales elevadas, de hasta 3.200 unidades USP/día, no produjeron efectos adversos consistentes. A

partir de un gran número de datos publicados, se han deducido rangos de dosis que pueden caracterizarse como seguros para los humanos, incluso cuando su uso se extiende durante un largo período de tiempo (EFSA, 2015b; Kappus & Diplock, 1992).

### 1.3.2.2. Extracto de romero

El extracto de romero (RE), conocido como aditivo E-392, es un antioxidante natural que se obtiene a partir de hojas secas molidas de *Rosmarinus officinalis L* y se caracteriza por su contenido en diterpenos fenólicos. El ácido carnósico (CA) y el carnosol (COL) son los principales agentes antioxidantes de manera que, tanto la riqueza del extracto en cuestión, como los MPL de los RE en general, se expresan teniendo en cuenta la suma de estos dos compuestos. Otros componentes antioxidantes presentes incluyen triterpenos y ácidos triterpénicos. El CA, con fórmula molecular  $C_{20}H_{28}O_4$ , tiene un peso molecular de 332,43 g/mol y un número de registro CAS 3650-09-7. El COL, con fórmula molecular  $C_{20}H_{26}O_4$ , tiene un peso molecular de 330,42 g/mol y un número de registro CAS 5957-80-2. La estructura molecular de ambos compuestos se refleja en la Figura I.17. (Diario Oficial de la Unión Europea, 2012).



**Figura I.17.** Estructura molecular de los principales diterpenos del extracto de romero: (A) ácido carnósico y (B) carnosol.

El RE se obtiene por extracción sólido-líquido de la hoja seca de romero utilizando disolventes de grado alimenticio, es decir, acetona o etanol. La

extracción con solventes es seguida por filtración, evaporación de solventes, secado y tamizado para obtener un polvo fino. Podrán incluirse fases adicionales de concentración y/o precipitación seguidas de desodorización, decoloración y normalización utilizando diluyentes y soportes de calidad alimentaria para obtener el producto final. La pureza del extracto final obtenido (expresada como suma de CA y COL) debe ser igual o superior al 5-13% p/p en función del método de extracción utilizado (Diario Oficial de la Unión Europea, 2012).

La Comisión técnica de aditivos alimentarios, aromatizantes, coadyuvantes de fabricación y materiales en contacto con los alimentos (Comisión técnica de AFC de la EFSA) evaluó la seguridad de los extractos de romero en 2008, para su uso como aditivo alimentario (EFSA ANS Panel, 2008). Tras esta evaluación de la EFSA, se autorizó el uso de extractos de romero como aditivo alimentario en la Unión Europea (UE) en varias categorías de alimentos con contenidos máximos, de conformidad con los anexos II y III del Reglamento (CE) no 1333/2008 sobre aditivos alimentarios («Reglamento (CE) N o 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo», 2008). A petición de la Comisión Europea en 2014, la ANS de la EFSA emitió un dictamen científico sobre la seguridad de las extensiones propuestas del uso de RE en grasas para untar a 30 mg/Kg y 100 mg/Kg en 2015. La Comisión técnica consideró asimismo en ese momento que las conclusiones de la comisión técnica de AFC de la EFSA en 2008 sobre la seguridad de los RE seguirían siendo válidas y que no era necesario reconsiderar la evaluación toxicológica disponible tras la introducción del uso de RE en esta nueva categoría de alimentos. Posteriormente, en 2018, a petición de la Comisión Europea, la comisión ANS de la EFSA realizó una evaluación mejorada de la exposición a los RE cuando es usado como aditivo alimentario, concluyendo que, la estimación de la exposición media más alta fue de 0,09 mg/Kg de peso corporal por día en niños (de 3 a 9 años) y el percentil 95 más alto de la exposición fue de 0,20 mg/Kg peso corporal por día en niños. Teniendo en cuenta las imprecisiones, la Comisión técnica llegó a la conclusión de que es muy probable que estas estimaciones de exposición sobrestimen la exposición real a los RE derivados de su uso como aditivo alimentario con arreglo al anexo II del reglamento (EC) No 1333/2008 (EFSA ANS Panel, 2018). En la actualidad, el RE es un aditivo alimentario autorizado en la UE con un MPL que oscila 15 y 400 mg/Kg en 33 categorías de alimentos enumeradas

en los anexos II y III del Reglamento (CE) no 1333/2008. Todos los MPL se expresan como la suma de CA y COL y algunos se expresan en base a la grasa del alimento («Reglamento (CE) N o 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo», 2008).

### **I.3.3. Antioxidantes emergentes de origen natural**

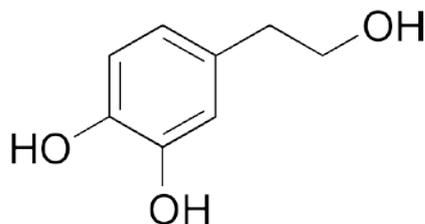
La búsqueda de fuentes baratas y abundantes de compuestos antioxidantes está atrayendo el interés mundial. Se están llevando a cabo investigaciones con vegetales, extractos de especias y subproductos de procesos industriales como fuentes de nuevas sustancias que, por su naturaleza fenólica, presentan un gran potencial como FRS. Es el caso del extracto de semilla de uva, rico en procianidinas y el extracto oliva, rico en hidroxitirosol, que han demostrado ampliamente su capacidad antioxidante a nivel fisiológico como suplementos nutricionales (Benavente-García, Castillo, Lorente, Ortuño, & Del Rio, 2000; Cadiz-Gurrea *et al.*, 2017; Castillo *et al.*, 2000b). En la actualidad ambos extractos han comenzado a ser estudiados como potenciales antioxidantes tecnológicos para su uso en la industria alimentaria (Ma & Zhang, 2017; Nieto, Martínez, Castillo, & Ros, 2017).

#### *I.3.3.1. Extracto de oliva*

La dieta mediterránea, rica en frutas y verduras frescas, se ha asociado a una baja incidencia de enfermedades cardiovasculares y cáncer, en parte debido a su alta proporción de compuestos bioactivos como vitaminas, flavonoides y polifenoles. El principal componente lipídico de esta dieta es el aceite de oliva que contiene grandes cantidades de ácidos grasos monoinsaturados y también antioxidantes como los polifenoles, responsables de las características organolépticas, de la estabilidad frente a la autooxidación y de la mayoría de las bondades para la salud relacionadas con el consumo de este aceite (Benavente-García *et al.*, 2000; Buckland & Gonzalez, 2015; López de Las Hazas, Piñol, Macià, & Motilva, 2017). Existe un potencial interesante para el uso de subproductos de la producción de aceitunas y aceite de oliva (extractos de hidroxitirosol).

El hidroxitirosol (HT), con fórmula molecular  $C_8H_{10}O_3$ , es un fenol anfipático con un peso molecular de 154,16 g/mol y una estructura fenil-etil-alcohólica.

También se denomina 3,4-dihidroxifeniletanol y su número de registro CAS es 10597-60-1. Su estructura molecular se representa en la Figura I.18.



**Figura I.18.** Estructura molecular del hidroxitirosol.

Este compuesto es parte de la fracción soluble de los componentes minoritarios de aceite de oliva virgen extra y está presente en una concentración muy alta en las hojas del olivo (*Olea europaea L.*). El HT es también uno de los principales compuestos presentes en el aceite de oliva y ha sido descrito como un antioxidante con numerosas actividades biológicas (Covas, de la Torre, & Fitó, 2015; Merola, Castillo, Benavente-García, Ros, & Nieto, 2017; Pérez-Bonilla, Salido, van Beek, & Altarejos, 2014).

Debido a la naturaleza fenólica del HT, se han realizado numerosos estudios con diferentes tipos de aceites de oliva, enriquecidos o no con este compuesto, para demostrar sus efectos antioxidantes, antiinflamatorios y antiteratogénicos (Bernini, Merendino, Romani, & Velotti, 2013; Granados-Principal *et al.*, 2014; Rodríguez-Morató *et al.*, 2015). Otros estudios también se han centrado en las propiedades antimicrobianas (Medina, de Castro, Romero, & Brenes, 2006; Zoric *et al.*, 2013) y dermatológicas (D'Angelo *et al.*, 2005) del HT, mostrando así las amplias propiedades beneficiosas para la salud de este compuesto. Gracias a todos estos hallazgos, el HT ha sido postulado como un nutraceutico para la prevención y tratamiento de diferentes enfermedades.

La Comisión Técnica de Productos Dietéticos, Nutrición y Alergias de la EFSA también ha considerado que los polifenoles de la aceituna (fruto del olivo, aguas residuales de la almazara o aceite de oliva, extracto y hoja de *Olea europaea*

*L.*), normalizados por su contenido de HT y sus derivados (por ejemplo, el complejo de oleuropeína), están suficientemente caracterizados en relación con las siguientes declaraciones de propiedades saludables: protección de las partículas de LDL contra el daño oxidativo (ID 1333, 1638, 1639, 1696, 2865), mantenimiento de las concentraciones normales de colesterol HDL en sangre (ID 1639), mantenimiento de la presión arterial normal (ID 3781), propiedades antiinflamatorias (ID 1882), contribuye a la salud de las vías respiratorias superiores (ID 3468), puede ayudar a mantener una función normal del tracto gastrointestinal (ID 3779), contribuye a las defensas del cuerpo frente a agentes externos" (ID 3467) (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA), 2011).

El HT se origina a partir de la hidrólisis de la oleuropeína (que es el principal constituyente de la familia de los secoiridoides presente en *Olea europaea L*) que se produce durante la maduración de las aceitunas y durante su almacenamiento (Benavente-García *et al.*, 2000; Charoenprasert & Mitchell, 2012). Cuando las aceitunas son procesadas para obtener su aceite mediante la molienda, se obtienen tres fracciones diferentes enriquecidas en polifenoles: aguas residuales de la almazara o alpechín, orujo y aceite de oliva. Debido al carácter anfipático del HT, este puede encontrarse en cualquiera de estas tres fracciones en forma libre, como acetato o como parte de compuestos más complejos como la oleaceína, el verbascósido y la oleuropeína (Boskou, 2008), aunque se encuentra mayormente en la fracción acuosa del alpechín.

El proceso de fabricación del extracto de oliva rico en HT (OE) se produce mediante la extracción de orujo de aceituna o el aislamiento del agua inherente a las aceitunas (el agua de vegetación). En este proceso, el orujo de aceituna se mezcla con agua acidificada y se somete a un tratamiento térmico (70-100 °C) durante 2-4 horas para completar la hidrólisis de la oleuropeína, el ligstrósido y sus agliconas a hidroxitirosol y tirosol, y para inactivar las enzimas del fruto. El extracto crudo resultante se ajusta a pH neutro y luego se homogeniza. Los siguientes pasos de separación por centrifuga y clarificación eliminan la pasta de aceituna y las partículas sólidas finas, quedando una fase líquida que contiene extracto acuoso de aceituna. Cuando se usa el agua de vegetación como materia prima, el proceso de fabricación comienza con una etapa de clarificación sin necesidad de tratamiento térmico en condiciones ácidas. La filtración cromatográfica de la fase líquida

clarificada produce un extracto de aceituna purificado que se concentra por evaporación para producir un líquido viscoso que contiene en torno a un 40% de HT (FDA, 2018).

A pesar de que el HT forma parte de alimentos naturales y saludables como el aceite de oliva, se han realizado varios estudios para demostrar su toxicidad. Esta toxicidad se ha medido en células y modelos animales mediante la evaluación de la toxicidad aguda, teratogenicidad, mortalidad, morbilidad o efectos mutagénicos (Auñón-Calles, Canut, & Visioli, 2013; Christian *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2016; Soni, Burdock, Christian, Bitler, & Crea, 2006) pero es escasa la literatura disponible al respecto en los seres humanos. Como consecuencia de su alta biodisponibilidad (>90%) este compuesto es fácilmente metabolizado por el cuerpo humano (Schaffer, Müller, & Eckert, 2010), lo que dificulta la realización de estudios que determinen si la concentración sanguínea final podría tener efectos tóxicos tras la ingesta de una alta concentración de HT, tanto como extracto puro como cuando forma parte de alimentos enriquecidos como el aceite de oliva extra virgen. En este sentido, algunos autores han reportado una citotoxicidad nula de los compuestos polifenólicos presentes en el aceite de oliva sobre células humanas aisladas de los tejidos de la cavidad bucal (Babich & Visioli, 2003). Actualmente, debido a la alta similitud entre el comportamiento del HT y otros compuestos fenólicos, se tienen en cuenta las descripciones de los estudios de toxicidad realizados con otros polifenoles para obtener una aproximación bastante precisa de su nula toxicidad a todos los niveles, aunque es necesario desarrollar más estudios para poder concluir esta afirmación en humanos.

Uno de los últimos estudios realizados en modelos animales para determinar la toxicidad subcrónica del HT fue realizado por Heilman *et al.* (2015). Estos autores utilizaron un extracto con una riqueza del 35% p/p en HT. Este extracto fue administrado a ratas hembras y machos por vía oral durante 90 días consecutivos, en dosis de 125, 250 y 500 mg HT/Kg/día. No se encontraron efectos toxicológicamente significativos. Estos investigadores no observaron ningún efecto adverso para 250 mg HT/Kg/día (Heilman *et al.*, 2015).

El OE ha sido reconocido como GRAS por la FDA con el nombre provisional de “preparación polifenólica del fruto de la oliva” (GRAS N°. 726) para uso como ingrediente y como antioxidante en productos de panadería; bebidas; productos

lácteos y sus sucedáneos; postres; grasas y aceites; jugos y néctares de frutas; mezclas de condimentos secos para carnes, aves y pescados; chicles; salsas y condimentos; aperitivos; y jugos de verduras a niveles de 5 a 10 mg de HT por porción de alimento (FDA, 2018).

Muchos estudios se han centrado en estudiar la vida útil de productos cárnicos en los cuales los antioxidantes sintéticos habían sido reemplazados por compuestos derivados de la oliva como el HT. Así, en la elaboración de embutidos fermentados enriquecidos con HT se observó una reducción de la oxidación lipídica de un 12-38% respecto a las muestras control (Chaves-López *et al.*, 2015). Del mismo modo, se ha reportado una reducción de la peroxidación lipídica en hamburguesas de carne de cordero enriquecidas con aceite de pescado (FA n-3) y HT a distintas concentraciones (100, 200 y 400 ppm) durante su almacenamiento (Muíño *et al.*, 2017). Resultados similares se obtuvieron en salchichas de carne de cerdo enriquecidas con HT (75 y 150 ppm) y almacenadas durante 14 días (Balzan *et al.*, 2017). Finalmente, dos estudios realizados en salchichas de pollo, demostraron que una pequeña cantidad de HT (50 ppm) es suficiente para mantener el color y reducir la oxidación de lípidos y proteínas hasta los 21 días de almacenamiento siendo este extracto combinado con otros ingredientes como aceite de oliva virgen extra y/o nueces. De la misma manera, compararon tres extractos: HT 23% de las aguas de olivar, HT 7% de las hojas de olivo y HT 7% de las aguas de olivar; y observaron que el HT 7% de las aguas de olivar era el más aceptable desde el punto de vista organoléptico.

Como hemos comentado, la carne puede ser enriquecida de forma exógena mediante el uso de extractos naturales para reemplazar aditivos sintéticos, además, la carne puede ser enriquecida de forma endógena a través de la dieta animal. Es el caso de Branciari *et al.* (2017), cuya investigación se basó en la alimentación de 297 pollos durante 21 días con tres tratamientos: dieta basal, dieta complementada con 82,5 g/Kg de una pasta rica en fenoles del olivo (4,6 ppm HT), y dieta complementada con 165 g/Kg del mismo producto (9,5 ppm HT). Demostraron que los pollos alimentados con una dieta enriquecida en HT presentaban mayor peso y menor oxidación lipídica, todo ello sin modificar la calidad sensorial de la carne (Branciari *et al.*, 2017).

### 1.3.3.2. Extracto de semilla de uva

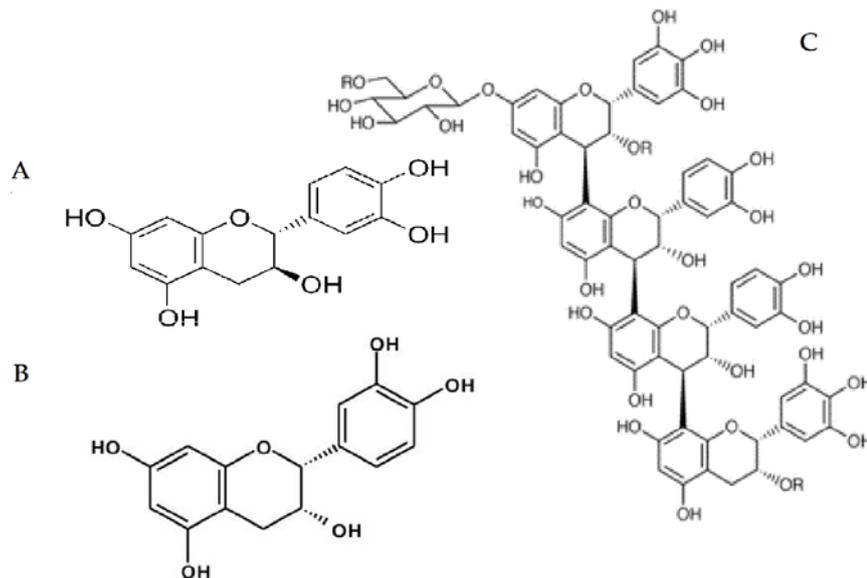
La uva es una de las frutas más cultivadas a nivel mundial, con una producción total 60 millones de toneladas, siendo Estados Unidos, China, Italia y Francia los principales productores (Bertrand Matthäus, 2008). Las uvas norteamericanas (*Vitis labrusca* y *Vitis rotundifolia*), europeas (*Vitis vinifera*) e híbridas francesas son las principales especies de uva (Girard & Mazza, 1998).

Las uvas se han utilizado para la elaboración del vino desde las antiguas civilizaciones griega y romana. En el proceso de vinificación se producen más de 0,3 Kg de subproductos sólidos por cada Kg de uva molida. El orujo de uva es el principal subproducto de este proceso, representando aproximadamente dos tercios de los sólidos totales, y se compone de hollejos (50%), semillas (25%) y tallos (25%) (Duba & Fiori, 2015). Las semillas de uva, obtenidas como subproducto industrial del proceso de vinificación, suponen una fuente relativamente barata de compuestos antioxidantes (Cádiz-Gurrea *et al.*, 2017). En los últimos años, el extracto de semilla de uva (GSE) se ha vuelto cada vez más popular en el mercado como suplemento nutricional, especialmente en Australia, Corea, Japón y Estados Unidos (Yamakoshi, Saito, Kataoka, & Kikuchi, 2002).

Las semillas maduras de *Vitis vinifera* son una importante fuente natural de compuestos fenólicos como procianidinas en forma de monómeros, oligómeros y polímeros de polihidroxi flavan-3-ols como (+)-catecina y (-)-epicatequina, que pueden acoplarse con ácido gálico para formar ésteres galatos o moléculas de azúcar para formar glucósidos (Weber *et al.*, 2007). Múltiples estudios describen el contenido de catequina, epicatequina y procianidinas en general en las semillas de uva maduras (Castillo *et al.*, 2001; Escribano-Bailón, Gutierrez-Fernandez, Rivas-Gonzalo, & Santos-Buelga, 1992; Santos-Buelga, Francia-Aricha, & Escribano-Bailón, 1995).

Las procianidinas están constituidas por un número variable de unidades de flavano unidas entre sí por enlaces C<sub>4</sub>-C<sub>6</sub> o C<sub>4</sub>-C<sub>8</sub> y pueden estar presentes en los GSE en un mezcla formada por dímeros, trímeros, tetrámeros, polímeros de hasta 15-16 unidades (Prieur, Rigaud, Cheynier, & Moutounet, 1994) y pequeñas cantidades de catequina y epicatequina (Bombardelli & Morazzoni, 1995; Jorge M.

Ricardo da Silva, Rigaud, Cheynier, Cheminat, & Moutounet, 1991; Jorge Manuel Ricardo da Silva, Rosec, Bourzeix, & Heredia, 1990) (Figura I.19).



**Figura I.19.** Estructuras de los principales principios activos presentes en el extracto de semilla de uva: (A) (+)-Catequina; (B) (-)-Epicatequina y (C) Tetrámeros de procianidinas.

La distribución y el contenido absoluto de procianidinas en los extractos de semillas de uva dependen principalmente de la materia prima de partida, pero puede ser modificado en función de los procedimientos utilizados para extraer estos polifenoles, así como en la posterior purificación y operaciones de cristalización. Es importante tener en cuenta la relación que existe entre el perfil molecular de los compuestos de procianidina y sus propiedades físicas y sus actividades biológicas y médicas (Castillo *et al.*, 2000b). Por otro lado, no existe un acuerdo claro sobre qué tamaño del oligómero o polímero es el responsable del grado de actividad biológica. Algunas fuentes concuerdan en que sólo los dímeros y los trímeros proporcionan algún beneficio para la salud, mientras que otros sostienen que los polímeros más grandes también pueden estar ligados a las

propiedades saludables de los extractos de semillas de *V. vinifera* (Amouroux, Jean, & Lamaison, 1998; Maffei Facino *et al.*, 1994; Saito, Hosoyama, Ariga, Kataoka, & Yamaji, 1998; Vennat, Bos, Pourrat, & Bastide, 1994; S. Zhang *et al.*, 2017).

Las procianidinas de las semillas de la uva han atraído la atención de los consumidores por sus efectos beneficiosos sobre la salud. En experimentos *in vitro*, estas sustancias han demostrado tener una fuerte actividad antioxidante y antirradicalaria frente a especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, modular la función inmunitaria y la activación plaquetaria, y producir vasodilatación mediante la inducción del óxido nítrico liberado desde el endotelio (Castillo *et al.*, 2000b; Jayaprakasha, Selvi, & Sakariah, 2003; Jayaprakasha, Singh, & Sakariah, 2001; Poudel, Tamura, Kataoka, & Mochioka, 2008; Varzakas, Zakyntinos, & Verpoort, 2016). Los GSE también han mostrado propiedades antitumorales. Varios estudios realizados en carcinoma colorrectal humano (Kaur, Singh, Gu, Agarwal, & Agarwal, 2006), carcinoma de células escamosas epiteliales de cabeza y cuello (Sun, Prasad, Rosenthal, & Katiyar, 2011) y células cancerígenas de próstata (Park *et al.*, 2011) han mostrado resultados prometedores. Por lo tanto, se sugiere que la suplementación con GSE podría ser un agente antitumoral efectivo en ámbitos clínicos. Del mismo modo ha sido descrito el efecto radioprotector contra el daño cromosómico inducido por rayos X y  $\gamma$  en células humanas (Castillo *et al.*, 2001, 2000b).

El GSE, con número de registro CAS: 85594-37-2, ha sido aprobado como GRAS por la FDA y se vende comercialmente como un suplemento dietético listado en la base de datos EAFUS (Everything Added to Food in the United States) (Perumalla & Hettiarachchy, 2011; «Substances Added to Food (formerly EAFUS)», 2019).

Bentivegna y Whitney reportaron un NOAEL de 1,78 g/Kg de peso corporal/día para el GSE en ratas y la cantidad normal de extracto de semillas de uva utilizada en aplicaciones alimentarias fue de 0,01-1% (Bentivegna & Whitney, 2002). Sano *et al.* (2007) reportaron por su parte la ausencia de cambios anormales en los análisis fisiológicos y clínicos realizados a los participantes de un estudio doble ciego después de tomar suplementos que contenían 200 y 400 ppm de GSE (calculado como proantocianidinas) durante 12 semanas. Además, tampoco se

observaron resultados preocupantes en la sedimentación urinaria de estos participantes, sugiriendo que la suplementación con estas dosis de GSE son seguras para el consumo humano (Sano *et al.*, 2007). De manera similar, un estudio de toxicidad oral subcrónica realizado por Yamakoshi *et al.* (2002) documentó la ausencia de toxicidad en ratas alimentadas con GSE como aditivo dietético al 0,02% (grupo de dosis baja), 0,2% (grupo de dosis media) y 2% (grupo de dosis alta) (p/p) durante 90 días. El NOAEL del GSE utilizado en el estudio de toxicidad oral subcrónica fue del 2%, que equivalía a 1410 mg/Kg de peso corporal en los machos y 1501 mg/Kg de peso corporal/día en hembras (Yamakoshi *et al.*, 2002). Por lo tanto, estos estudios indican una falta de toxicidad para el consumo de GSE, a la espera de nuevos estudios toxicológicos más sistemáticos.

Debido a sus propiedades antioxidantes, las procianidinas presentes en las semillas de uva también pueden ser aprovechadas para la conservación de productos alimenticios. El efecto antioxidante del GSE sobre productos cárnicos ha sido ampliamente estudiado. Ahn y cols. (2008) observaron que la adición de GSE mejoró la estabilidad oxidativa y redujo la concentración de hexanal en un 97% en la carne cocida molida después de tres días de almacenamiento en refrigeración con respecto al control sin antioxidantes añadidos (Ahn, Kim, Seo, Choi, & Kim, 2008). Del mismo modo, Lau y King (2003) también reportaron una mejora similar en la estabilidad oxidativa de las hamburguesas de pavo tras añadir GSE en una concentración de 1,0 % y 2,0% (p/p), observando una reducción de las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) de hasta 10 veces en comparación con el control. Los autores describieron la aparición de un ligero retrogusto amargo y olor a vino tras añadir el extracto (Lau & King, 2003). Martínez *et al.* (2014) observaron que la incorporación de GSE al 0,5% (p/p) sobre emulsiones cárnicas de pavo y cerdo demostró ser adecuada para prevenir la oxidación lipídica y mejorar de las emulsiones; este efecto se mantuvo después de la digestión gástrica simulada de las muestras (Martínez, Nieto, Castillo, & Ros, 2014).

La actividad antioxidante de los GSE puede verse influenciada por las condiciones de calentamiento, como la temperatura y el tiempo. En un estudio que evaluó el efecto de las condiciones de calentamiento sobre la actividad antioxidante de los GSE, Kim *et al.* (2006) informaron que el tratamiento térmico aumentaba significativamente las concentraciones de cafeína y galato de galocatequina en los

GSE, sugiriendo que el calentamiento podría ser usado como un método para mejorar la actividad antioxidante de estos extractos (Kim *et al.*, 2006). Dado que los polifenoles de las semillas de uva poseen actividad antibacteriana, los GSE pueden ser incorporados a los alimentos para evitar la proliferación de patógenos transmitidos por los alimentos, como *L. monocytogenes* (Anastasiadi, Chorianopoulos, Nychas, & Haroutounian, 2009).

Debido a la elevada capacidad antirradicalaria de las procianidinas presentes en los GSE, estos extractos vegetales se incluyen también en las formulaciones de productos cosméticos antienvjecimiento (Allemann & Baumann, 2008).

#### **I.3.4. Estudios comparativos de antioxidantes**

Tras evaluar toda la información incluida en este capítulo de introducción general, parece resultar evidente que existen múltiples opciones en cuanto al uso de potenciales antioxidantes alimentarios, tanto de naturaleza sintética, como de origen natural y dichas opciones contemplan una amplia gama de estructuras moleculares y propiedades físico-químicas que debemos saber utilizar de forma correcta en cada matriz alimentaria de naturaleza lipídica.

Son muchos los estudios que se han realizado hasta ahora sobre estas cuestiones y, en consecuencia, muchas son las consideraciones y conclusiones que se han podido obtener de ellos, sin embargo, la mayoría de estos estudios solo pueden considerarse parciales, incluso muy parciales, en relación con la actividad desarrollada en la presente memoria.

En nuestro trabajo hemos estudiado simultánea y comparativamente doce antioxidantes diferentes, a través de tres metodologías de evaluación y en tres matrices alimentarias bien caracterizadas y claves en el mercado actual de la alimentación.

Respecto al número de compuestos incluidos en el estudio, la mayoría de los trabajos publicados contienen comparativas binarias (Basaga, Tekkaya, & Acikel, 1997; Sayyad, Jafari, & Ghomi, 2017), ternarias (Alizadeh, Nayebzadeh, & Mohammadi, 2016; Aruoma, Halliwell, Aeschbach, & Löliger, 1992; Chen *et al.*, 2014; Guo *et al.*, 2016; I. Merrill, A. Pike, Ogden, & Dunn, 2008; Martínez, Penci, Ixtaina, Ribotta, & Maestri, 2013), o incluso como máximo hasta 6 compuestos

(Đilas *et al.*, 2012; Michael H Gordon & Kourkimská, 1995; Redondo-Cuevas, Castellano, & Raikos, 2017; Y. Zhang *et al.*, 2010).

Respecto a la caracterización de los productos empleados, sobre todo en el caso de los extractos naturales, en la mayoría de los casos no se incluye la identificación y cuantificación específicas de los principios activos responsables de la potencial actividad antioxidante, incluyendo por supuesto, a los extractos de romero (Basaga *et al.*, 1997; Michael H Gordon & Kourkimská, 1995; I. Merrill *et al.*, 2008; Klančnik, Guzej, Kolar, Abramovič, & Možina, 2009; Martínez *et al.*, 2013; Martínez-Tomé *et al.*, 2001; Redondo-Cuevas *et al.*, 2017; Sayyad *et al.*, 2017; Y. Zhang *et al.*, 2010). Se ha intentado realizar igualmente un constante estudio estructura actividad.

Respecto a las concentraciones de los compuestos estudiados, hay también que destacar que, a diferencia de la mayoría de los estudios, se han empleado en todos los experimentos cantidades iguales de principios activos y no cantidades iguales de compuesto. No es razonable, desde el punto de vista de un estudio estructura-actividad, comparar la eficacia de 100 mg de un compuesto con un 99% de principio activo con la de 100 mg de un compuesto con 5% de activos. La literatura consultada que realiza una comparativa de actividad antioxidante entre sustancias, no lo hace, en ningún caso, a igualdad de concentración de activos (Alizadeh *et al.*, 2016; Basaga *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2014; Đilas *et al.*, 2012; Michael H Gordon & Kourkimská, 1995; Guo *et al.*, 2016; I. Merrill *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2013; Martínez-Tomé *et al.*, 2001; Redondo-Cuevas *et al.*, 2017; Sayyad *et al.*, 2017; Y. Zhang *et al.*, 2010).

Respecto a las matrices alimentarias, lo habitual es emplear una única matriz (Alizadeh *et al.*, 2016; Basaga *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2014; Michael H Gordon & Kourkimská, 1995; Guo *et al.*, 2016; Martínez *et al.*, 2013; Sayyad *et al.*, 2017; Y. Zhang *et al.*, 2010).

En definitiva, esta compleja matriz de experiencias y resultados no ha sido nunca planteada, y por ello, establecer una comparativa entre conclusiones muy parciales por el ámbito de estudio, puede que no permitiese una correcta interpretación de muchos de los resultados globales del presente estudio, de ahí

que, a lo largo del desarrollo de la presente memoria no seamos muy exhaustivos en el desarrollo de una comparativa de resultados con estudios precedentes potencialmente relacionados. Nos encontramos ante el desarrollo de una memoria destinada a una Tesis Doctoral Industrial, un trabajo de índole científica-industrial cuyo objetivo básico es, sin duda, valorar en sí misma la comparativa realizada en tan diversas condiciones de estudio y, en consecuencia, obtener conclusiones reales y aplicables al uso de la protección antioxidante en el ámbito de la industria alimentaria.



## **II-OBJETIVOS**



## II-OBJETIVOS

El trabajo de investigación que se describe en esta memoria se planteó con dos objetivos generales:

- Realizar un estudio comparativo, desde el punto de vista de su aplicabilidad industrial, y a la misma dosis de compuestos activos, de la eficacia frente a la oxidación lipídica entre doce compuestos antioxidantes: cuatro antioxidantes de origen sintético y ocho de origen natural, de ellos, cinco extractos de romero y tres extractos procedentes de otras fuentes vegetales.
- Estudiar la influencia de la distribución diterpénica (ácido carnósico/carnosol) en los extractos de romero sobre la capacidad inhibitoria de la oxidación lipídica.

Para abordar este objetivo general nos marcamos los siguientes objetivos parciales:

- Describir los antioxidantes sintéticos seleccionados para el presente estudio con objeto de poder relacionar posteriormente los conceptos de estructura-actividad.
- Obtener distintos extractos ricos en polifenoles a partir de materiales vegetales: romero, semilla de uva y aguas de vegetación de la manufactura de la oliva.
- Analizar exhaustivamente la composición de principios activos antioxidantes de los extractos obtenidos y objeto de estudio.
- Estudiar la capacidad antirradical *in vitro* de todas sustancias objeto de estudio.
- Determinar la capacidad antilipoperoxidante de todas las sustancias objeto de estudio, aplicadas en tres aceites alimentarios de distinta naturaleza lipídica: aceite de girasol alto oleico (rico en n-9), aceite de

semilla de uva (rico en n-6) y aceite de pescado (rico en n-3); realizando dicho estudio tanto en condiciones de almacenaje, a corto y medio plazo (estabilidad), como de oxidación acelerada (Rancimat).

# Capítulo 1: Extracción y Caracterización de Antioxidantes



# CAPÍTULO 1. EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ANTIOXIDANTES.

## 1.1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

El hecho de que el uso de antioxidantes sintéticos se haya relacionado con potenciales riesgos para la salud, junto con una mayor conciencia de los consumidores sobre la seguridad alimentaria, han creado la necesidad de identificar fuentes naturales alternativas de sustancias bioactivas en busca de antioxidantes alimentarios más seguros. Entre los antioxidantes naturales se encuentran los compuestos polifenólicos, metabolitos secundarios aromáticos de origen vegetal.

Es ampliamente reconocido que el romero (*Rosmarinus officinalis L.*) posee propiedades tanto aromatizantes, como antioxidantes. Por este motivo, el extracto de romero (RE) es utilizado en la actualidad para prevenir la oxidación en los alimentos. Este antioxidante se ajusta al aditivo alimentario E-392 y representa una alternativa al uso de antioxidantes sintéticos en la industria alimentaria (Jia Xie, VanAlstyne, Uhlir, & Yang, 2017). Se sabe con certeza que, en el RE, son el ácido carnósico (CA) y el carnosol (COL) los principales polifenoles responsables de la capacidad de inhibir la peroxidación lipídica. Sin embargo, existe cierta controversia sobre el mayor o menor poder antioxidante del CA en comparación con el COL, su lactona intramolecular, pero hay pocos estudios que tengan en cuenta cómo la variación en la distribución de estos dos diterpenos (CA/COL) podría afectar la actividad antioxidante del RE (del Baño *et al.*, 2003; Jordán, Lax, Rota, Lorán, & Sotomayor, 2012; Jordán, Castillo, Bañón, Martínez-Conesa, & Sotomayor, 2014).

La uva (*Vitis vinifera*) es una importante fuente natural de oligómeros y polímeros de catequina y epicatequina, que también se denominan procianidinas (Cadiz-Gurrea *et al.*, 2017; Castillo *et al.*, 2000a). Se ha descrito que alrededor del 60-70% del total de los compuestos fenólicos extraíbles de la uva se encuentran en las semillas (Wei *et al.*, 2017). Tales compuestos fenólicos, presentes en el extracto de semilla de uva (GSE), han sido reportados como potentes secuestradores de radicales y se ha encontrado que exhiben extraordinarias propiedades

cardioprotectoras (Ma & Zhang, 2017; Sagdic *et al.*, 2011). Existen también algunos estudios que sugieren que GSE puede ser un antioxidante muy eficaz en la inhibición de la peroxidación lipídica en carnes (Ma & Zhang, 2017).

Los compuestos fenólicos presentes en la aceituna (*Olea europea*) también han despertado especial interés por su conocida y amplia gama de actividades biológicas junto con sus efectos sobre la salud (Bulotta *et al.*, 2014; Oliveras-López, Berná, Jurado-Ruiz, López-García de la Serrana, & Martín, 2014). Se ha prestado especial atención al extracto de oliva (OE) rico en hidroxitirosol cuya capacidad para inhibir la oxidación de lípidos ha sido ampliamente estudiada (Flaiz *et al.*, 2016; Martin *et al.*, 2014; Nieto *et al.*, 2017)

GSE y OE se incluyeron en este estudio con el único propósito de abarcar otros elementos estructurales como referencia. Además, la información obtenida pretende complementar la proporcionada por otros estudios que se están llevando a cabo continuamente en la búsqueda de nuevos antioxidantes tecnológicos de origen natural.

Todos los extractos vegetales sometidos a estudio en esta memoria (cinco RE, un GSE y un OE), fueron comparados en cuanto a su actividad antioxidante con cuatro sustancias de origen sintético de uso extendido en la industria alimentaria para tal fin. Los antioxidantes sintéticos incluidos en este estudio fueron: el butilhidroxianisol (BHA) que fue adquirido de Dupont-Danisco-Dow Chemical (Copenhague, Dinamarca), el butilhidroxitolueno (BHT) de Indukern (Barcelona, España), la *terc*-butilhidroquinona (TBHQ) y el palmitato de ascorbilo (AP) de Dongguan Green Food Technology (Guangdong, China).

Se incluyó también una mezcla comercial de tocoferoles (TOC), suministrada por la compañía Ingrenat (Murcia, España).

La legislación vigente que regula el uso de aditivos como antioxidantes alimentarios habla de dosis de aplicación de éstos en términos de miligramos de principio activo antioxidante (PAA) por kilogramo/litro de alimento (ppm). En el caso del RE se habla de PAA como suma de sus dos diterpenos mayoritarios: CA y COL. Por esta razón, es de vital importancia conocer el contenido absoluto de los principales PAA de cada sustancia analizada

para poder comparar la actividad antioxidante de cada sustancia a la misma concentración de los principios activos correspondientes y no de los compuestos en sí. Por ejemplo, sería engañoso comparar un extracto que contiene 15% de diterpenos con la misma cantidad de otro compuesto, por ejemplo, BHT, con una pureza del 99%. Sólo así es posible evaluar la eficiencia real relativa de cada estructura molecular. Es evidente, en este sentido, que la estricta identificación y cuantificación de los compuestos activos en cada extracto natural estudiado es un requisito previo para interpretar correctamente los resultados obtenidos.

Los objetivos de este capítulo de la memoria fueron los siguientes:

- A partir de un mismo lote de hoja de romero desecada, obtener cinco extractos de romero distintos, tanto en cuanto a su contenido absoluto de diterpenos (CA y COL), como a la distinta distribución de estos (CA/COL) dentro de los extractos.
- Obtener los extractos de semilla de uva y de oliva a partir de semillas de uva deshidratadas y aguas de vegetación del olivar, respectivamente.
- Identificar y cuantificar por cromatografía líquida (HPLC) los principales principios activos antioxidantes de los distintos extractos vegetales obtenidos y del extracto natural rico en tocoferoles.

## 1.2. EXTRACCIÓN DE MATERIAL VEGETAL

### 1.2.1. Consideraciones generales de los métodos de extracción

Los extractos vegetales fueron obtenidos en los laboratorios de Nutrafur-IFF-Natural Product Solutions (Murcia, España), siguiendo los protocolos industriales de trabajo homologados por el Dpto. de Garantía de Calidad de la Compañía y certificados como Food Safety Certificate ISO 22000:2005 y Certification GMP NFS 173 Food Supplements (FDA).

En las descripciones de proceso que se incluyen y detallan a continuación, se han omitido algunos detalles, datos y parámetros que no pueden ser revelados de forma explícita, obviamente, obedeciendo a los derechos de propiedad industrial de la empresa Nutrafur, perteneciente a la División de Natural Product Solutions de la multinacional norteamericana International Flavors & Fragrances (IFF).

En estos procesos de extracción existen etapas similares en lo que respecta a sus características técnicas de desarrollo y ejecución (ver diagramas de flujo en Figuras 1.1; 1.2 y 1.3). Con objeto de evitar reiteraciones en cada uno de los apartados correspondientes a cada extracto, procedemos a describir a continuación dichos procesos:

#### 1. Molienda del material vegetal para la extracción.

Se realizó empleando una picadora (Moulinex A320R1, Moulinex), hasta conseguir un material granulado, con un tamaño de partícula promedio de 1-2 mm de diámetro.

#### 2. Disolvente/medio de extracción.

El agua empleada tanto en la mezcla inicial de disolventes de extracción, como en las etapas de lavado y filtrado fue agua procedente de la planta de ósmosis de Nutrafur. El etanol empleado en los procesos de extracción fue alcohol rectificado de melazas de remolacha suministrado por Azucarero Montero (Granada, España) (etanol grado alimentario del 94-96%). La acetona empleada, fue suministrada por CEPESA Química (Madrid, España) (Número CAS: 67-64-1; Número CE: 200-662-2; Número REACH: 01-2119471330-49-0016).

3. Homogenización planta-solvente y proceso de extracción.

Se realizaron en matraz Erlenmeyer cerrado, con sistema guía de agitación. Se empleó un agitador de varilla (R18, Marienfeld) a una velocidad de 150-300 r.p.m. El medio de extracción se mantuvo inertizado durante el proceso mediante un suave flujo continuo de N<sub>2</sub>. En aquellas etapas en las que se precisó una temperatura distinta a la temperatura ambiente, se utilizó una placa de agitación magnética calefactora (C-MAG HS 7 Digital, IKA).

4. Filtración del material vegetal.

Se llevaron a cabo empleando matraz Kitasato, embudo Büchner y papel de filtro de celulosa (Ø 40-50 µm). Para facilitar el filtrado se generó un vacío de 760 mm de Hg.

5. Etapas de clarificación/microfiltración de las disoluciones de trabajo.

Se llevaron a cabo empleando matraz Kitasato, embudo Büchner y placa filtrante Seitz, tipo AF100 (Ø 0,2- 1,0 µm). Para facilitar el filtrado se generó un vacío de 760 mm de Hg.

6. Concentración/evaporación de las diluciones de trabajo (extracciones y otras).

Se llevó a cabo en un evaporador rotativo (Laborota 4000, Heidolph) a una temperatura de 40-60°C, generando un vacío de 760 mm de Hg.

7. Secado (obtención del extracto en forma pulverulenta/cristalina).

Las mismas condiciones de temperatura y vacío se utilizaron en las etapas de secado del extracto, empleando en este caso un desecador termostático a vacío (Vacuo-Temp, Selecta).

8. Molienda del extracto seco final obtenido.

El material seco fue molido con un molinillo (Taurus Aromatic, Taurus) hasta un tamaño de partícula 100% < 200 µm.

### 1.2.2. Extractos de Romero

Los cinco RE estudiados en este proyecto de investigación (RE1-RE5) se obtuvieron a partir de un mismo lote de hojas de romero (*Rosmarinus officinalis*). El romero procedía de uno de los suministradores habituales de Nutrafur a escala

industrial y fue recolectado en Ossa de Montiel (Albacete) en los meses de marzo-abril de 2015. Dicho material es, específicamente, hoja de romero desaceitada y deshidratada, que constituye uno de los materiales habituales de trabajo en Nutrafur para la manufactura de extractos de esta planta.

La figura 1.1. describe, de forma global, el diagrama general de obtención de dichos extractos.

A partir de la ya mencionada hoja seca de romero molida, el proceso de extracción fue exactamente el mismo para la obtención de los extractos RE2 y RE3, teniendo, como única diferencia, las proporciones de agua y acetona en la mezcla empleada como disolvente de extracción. Aunque no pueden especificarse las proporciones exactas de cada una de las mezclas, si es posible indicar que la mezcla empleada para obtener el extracto RE2 mostraba una mayor proporción de acetona que de agua. Además, en la obtención de dicho extracto RE2 se adicionó una cierta cantidad de carbón activo en el proceso de extracción (Carbopal-Gn, Quimidroga, Barcelona, España), con objeto de obtener un extracto decolorado (libre de tono verdoso procedente de las clorofilas de la hoja).

Las extracciones se llevaron a cabo durante 1 hora a temperatura ambiente. La ratio material vegetal: disolvente fue de 1:5 (p:v). Transcurrido el tiempo correspondiente, el medio/suspensión de extracción se filtró en las condiciones previamente descritas, desechando el material vegetal extraído. La disolución filtrada obtenida se concentró hasta evaporar la acetona en su práctica totalidad. Durante este proceso y, como lógica consecuencia de la disminución de la proporción de acetona en el medio (responsable de la solubilización de los compuestos diterpénicos), se produce progresivamente la precipitación/cristalización de los diterpenos (CA y COL), así como de otras estructuras di- y tri-terpénicas extraídas de la hoja. Una vez eliminada la acetona, el medio acuoso se enfría a temperatura ambiente y se procede a la filtración del sólido precipitado/cristalizado. El sólido obtenido fue lavado con agua y sometido a un proceso de secado a vacío. Una vez seco, el extracto sólido fue molido. Con este proceso se obtuvieron RE2 y RE3. Estos dos extractos constituyeron, paralelamente, y mediante procesos diferentes (ver Figura 1.1.), el material empleado para obtener los restantes RE.

Para obtener el único extracto “líquido” de romero estudiado, se mezcló RE2 con aceite de girasol de alto oleico en una ratio 1:4 (p/ p). Esta mezcla se homogenizó agitándose de forma intensa durante 2 horas a 40°C. Posteriormente, se filtró la mezcla y se obtuvo un aceite con una determinada concentración de diterpenos, mayoritario en CA (el COL, una lactona intramolecular, es menos soluble en aceites por carecer de grupo carboxilo libre), que se denominó extracto RE4.

Los extractos RE1 y RE5 se obtuvieron a partir del extracto RE3. Para ello, se empleó un proceso cuyo objetivo consistía en una “separación” de diterpenos (CA y COL). Para ello, el extracto RE3 fue sometido a un proceso de lavado con una mezcla de agua y acetona en una proporción 60-40% (v/v), respectivamente, empleando una ratio 1:3 (p / v) y durante 1 hora a temperatura ambiente. La suspensión se filtró, obteniendo un material insoluble y una disolución.

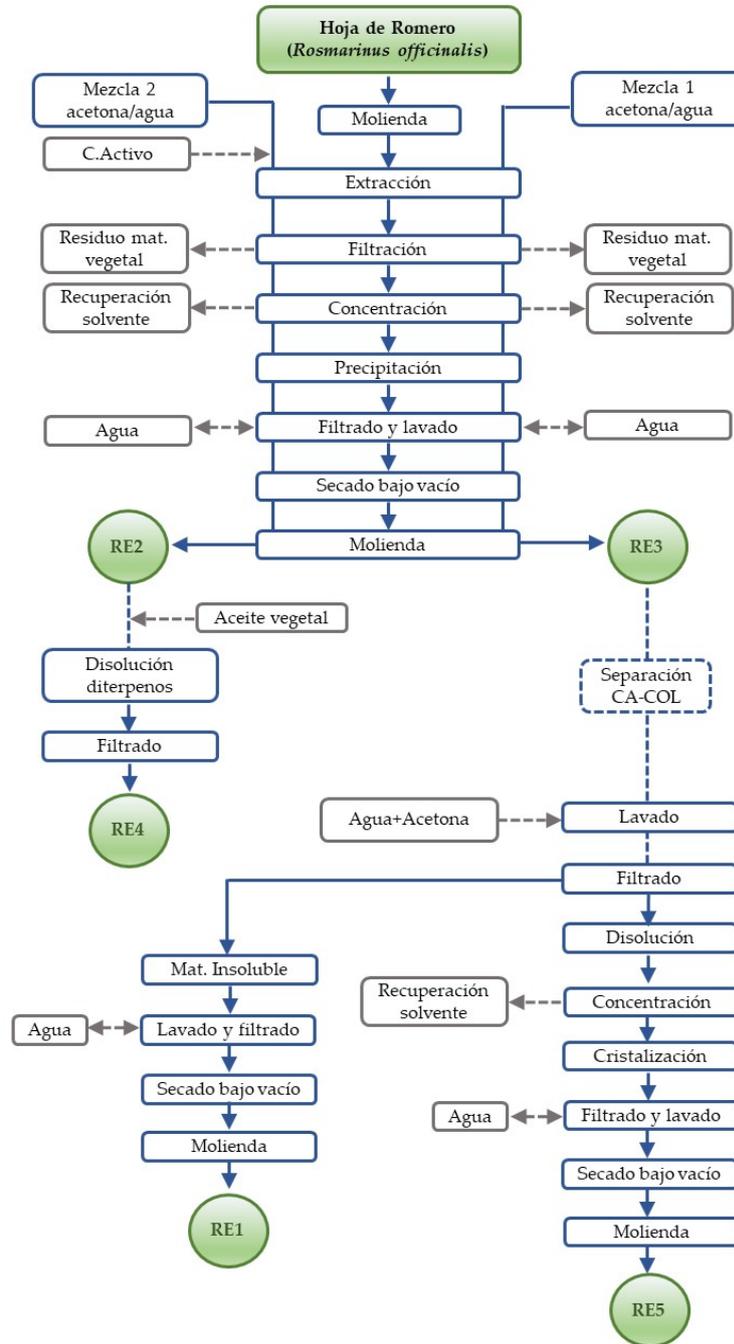
El sólido insoluble se lavó con agua, empleando una ratio 1:12 (p / v) y durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras filtrar el material lavado, se secó en condiciones habituales de vacío y fue molido, dando lugar al extracto RE1. Este extracto es el que presenta la mayor proporción de COL.

La disolución agua-acetona antes mencionada, se concentró evaporando por completo la acetona presente, dando lugar a la precipitación / aparición de cristales de un sólido amarillento muy enriquecido en CA. El sólido obtenido se lavó con agua, empleando una ratio 1:8 (p / v) y durante 1 hora a temperatura ambiente.

Tras filtrar el material lavado, se secó en condiciones habituales de vacío y fue molido, dando lugar al extracto RE5.

### 1.2.3. Extracto de semilla de uva

Para obtener este extracto, se empleó como material vegetal de partida semillas limpias y deshidratadas de uva tinta (*Vitis vinifera* L.) de la variedad tempranillo, recolectadas en Utiel (Requena), en los meses de agosto-septiembre de 2016. Una vez molidas las semillas, se sometieron a un proceso de extracción con una mezcla hidro-alcohólica (> 75% etanol) empleando una ratio 1:5 (p/v) y durante 2 horas a temperatura ambiente.



**Figura 1.1.** Diagrama de flujo del proceso global de extracción de los extractos de romero: RE1, RE2, RE3, RE4 y RE5.

Posteriormente, siguiendo el protocolo descrito en la Figura 1.2, el medio de extracción fue filtrado y la disolución obtenida se concentró/evaporó en condiciones de vacío, hasta eliminar el etanol y alcanzar un jarabe con una concentración de sólidos totales en el rango 65-70%. En estas condiciones, se produjo la precipitación de sustancias diversas de naturaleza lipofílica, que fueron eliminadas mediante un proceso de clarificación /microfiltración a través de placas filtrantes de sílice-celulosa de 1 micra. El filtrado obtenido en este proceso se concentró y, posteriormente, se secó (a vacío) y molió, dando lugar al GSE.

#### 1.2.4. Extracto de oliva

El EO rico en HT se obtuvo a partir de un material muy característico de la actividad del olivar y, más concretamente, de la manufactura del aceite de oliva, se trata del conocido “alpechín”, técnicamente denominado “aguas de vegetación del olivo” (origen Málaga, España). Este material contiene muy pequeñas concentraciones de polifenoles característicos de esta especie, entre ellos, el HT. Dadas estas bajas concentraciones y el hecho evidente de que se trata de un líquido, no resulta adecuado el uso de técnicas habituales de extracción sólido/líquido, ni siquiera líquido/líquido (sería preciso el uso de disolventes orgánicos), por ello, el proceso de “enriquecimiento” del HT se realiza mediante el uso de resinas de adsorción tipo Amberlita XAD-16 (Sally Qu Sunresin New Materials Co., Ltd, Xian, China). La Figura 1.3. refleja el proceso de extracción del OE.

La columna se preparó/regeneró haciendo pasar por la resina una dilución de hidróxido sódico al 1% (proporción resina-NaOH 1%: 1/3); posteriormente se lavó con abundante agua hasta conseguir un pH inferior a 10,75 (pHmetro HI98190, Hanna). La columna se activó mediante el paso de una disolución de ácido mineral al 1% (proporción resina-ácido 1%: 1/1), realizándose a continuación el correspondiente lavado hasta conseguir un pH superior a 4.

Tras dichas etapas, se procedió a alimentar la resina con las “aguas de vegetación”, (proporción resina-aguas de vegetación: 1/5). Se recogió el rechazo obtenido y se procedió a realizar la operación de desorción, empleando agua osmotizada a un pH ligeramente ácido. El proceso de desorción se continuó hasta que la presencia de HT en las aguas de desorción (control HPLC) fue inferior a

0,01%). El volumen de agua de desorción se concentró a vacío en un rotavapor hasta obtener un jarabe de unos 70-80% sólidos totales.

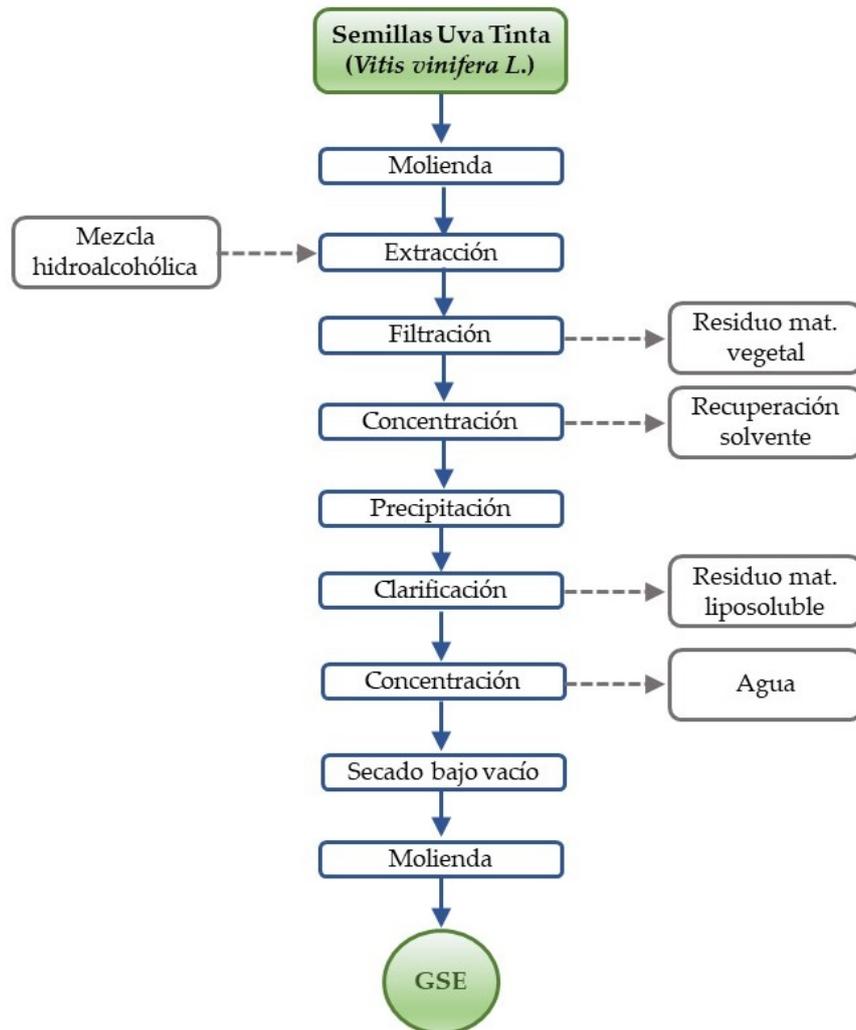
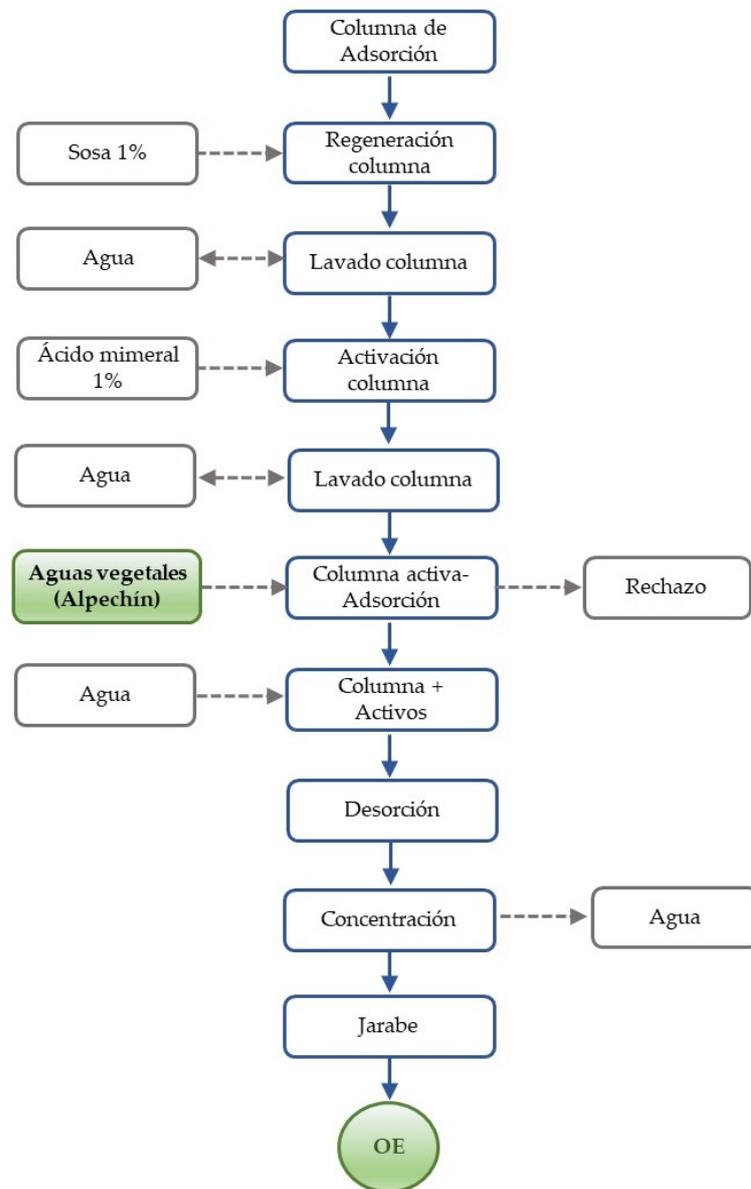


Figura 1.2. Diagrama de flujo del proceso de extracción del extracto de semilla de uva, GSE.



**Figura 1.3.** Diagrama de flujo del proceso de extracción del extracto de oliva, OE.

### 1.3. CUANTIFICACIÓN CROMATOGRÁFICA DE POLIFENOLES

#### 1.3.1. Método

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es la técnica empleada por excelencia en la cuantificación de compuestos polifenólicos de origen vegetal, que son los responsables de la actividad antioxidante de los extractos estudiados en este proyecto. Los métodos empleados en estas determinaciones han sido los ya protocolizados y validados internamente de acuerdo con normas GMP (Certification GMP NFS 173 Food Supplements (FDA) y otras normas internacionales) por los Dptos. De Control de Calidad y Garantía de Calidad de Nutrafur. Algunos de estos métodos ya han sido empleados en otros trabajos previos de investigación e incluidos en diversas publicaciones. Dichos métodos generales se han ido modificando y adaptando a las diferentes materias primas vegetales, en busca de una más adecuada elucidación y cuantificación de los principios activos identificados en cada una de ellas.

#### 1.3.2. Reactivos

Todos los reactivos y disolventes utilizados fueron de calidad reactivo para análisis o químicamente puros.

- Agua HPLC (361074.1612- PanReac)
- Acetonitrilo (221881.0516-PanReac)
- Ácido fosfórico (131032.1211- Panreac)
- Ácido acético glacial (AC03442500- Scharlau)
- Metanol (361091.1612-PanReac)
- Dimetilsulfóxido (131954.1611-PanReac)
- Estándares de referencia:
  - Catequina (C1251- Sigma Aldrich)
  - Epicatequina (E1753- Sigma Aldrich)
  - $\alpha$ -tocoferol (T3251- Sigma Aldrich)
  - $\delta$ -tocoferol (T2028-Sigma Aldrich)
  - $\gamma$ -tocoferol (T1782- Sigma Aldrich)

- Ácido carnósico (C0609- Sigma Aldrich)
- Carnosol (C9617- Sigma Aldrich)
- Hidroxitirosol (4999S- Extrasynthese)

### 1.3.3. Procedimiento y expresión de resultados

#### 1.3.3.1. Extractos de Romero

Para la cuantificación de los diterpenos (CA y COL) en los RE, los extractos se disolvieron en metanol en proporciones variables en el rango 0,2 - 4 mg/mL, en función de la concentración de diterpenos esperada para cada uno de ellos; las soluciones resultantes se filtraron a través de una membrana de nylon de 0,45 µm antes de proceder a su inyección.

El equipo HPLC empleado fue un Hewlett-Packard HP 1100 equipado con un detector de array de diodos. La fase estacionaria fue una columna analítica C18 LiChrospher 100 (250 x 4 mm d.i.) con un tamaño de partícula de 5 µm (Merck, Darmstadt, Alemania). La temperatura se mantuvo a 30°C. Se utilizó un flujo de elución de 0.75 mL/min, y los cambios de absorbancia fueron monitorizados a 230 nm.

Para la separación de los diferentes diterpenos presentes en los RE, se utilizó una modificación del método descrito por Thorsen y Hildebrandt (Thorsen & Hildebrandt, 2003), método que, inicialmente, fue desarrollado por los autores en colaboración con nuestro equipo de investigación (Dr. Castillo). Se utilizó un sistema de elución isocrático, empleando como fase móvil acetonitrilo-agua- ácido fosfórico (65:35:0,2), siendo resueltos todos los picos del cromatograma en un tiempo de 30 min.

#### Expresión de resultados

Una vez identificados los picos correspondientes a CA y COL por identidad de los tiempos de retención (Rt) y espectro UV (array de diodos) con los de los

$$\% \text{ CA} = \frac{\text{Ar CA}_{\text{Pb}}}{\text{Ar CA}_{\text{Std}}} \times \frac{\text{Wt Std}}{\text{Wt Pb}} \times \% \text{ CA patrón}$$

correspondientes patrones de referencia, se realizó la cuantificación de estos mediante el siguiente cálculo (igual para COL):

Siendo:

ArCAPb: área pico CA muestra problema.

ArCAStd: área pico CA compuesto patrón.

Wt Pb: peso de muestra problema en mg.

Wt Std: peso de compuesto patrón en mg.

### *1.3.3.2 Extracto de semilla de Uva*

Para la cuantificación de procianidinas en el GSE, el extracto se disolvió en metanol en una proporción de 3 mg/mL y la solución se filtró a través de una membrana de nylon de 0.45µm para ser analizada por cromatografía.

El equipo de cromatografía HPLC, el detector de array de diodos, la fase estacionaria (columna) y las condiciones físicas de análisis, fueron las mismas que las mencionadas para el análisis cromatográfico de los RE. Se empleó un caudal de flujo de 1 mL/min y los cambios en la absorbancia fueron monitorizados a 280 nm.

Para realizar el análisis de separación de los flavan-3-oles presentes en el GSE se utilizó una modificación del método descrito por Castillo *et al.* (Castillo *et al.*, 2000b; Martínez *et al.*, 2014).

La fase móvil para el análisis cromatográfico fue: (A) ácido acético/agua (1:99) y (B) acetonitrilo. Se empleó un sistema de gradiente lineal desde 96 % (A) y 4 % (B) a 90 % (A) y 10 % (B) durante 25 min; cambiando a 87 % (A) y 13 % (B) en 5 min (30 min, tiempo total); a 50 % (A) y (B) en 5 min (35 min, tiempo total); re-equilibrando finalmente a la composición inicial de eluyentes en 10 min (45 min, tiempo total).

### Expresión de resultados

Las catequinas y otros flavan-3-oles (procianidinas) en GSE fueron identificados por sus espectros UV obtenidos con el detector de array de diodos. El contenido absoluto de catequina y epicatequina se cuantificó utilizando sus respectivos patrones, mientras que los otros compuestos principales (dímeros,

trímeros, polímeros, etc.) se cuantificaron utilizando catequina como patrón de referencia (se empleó la misma fórmula de cuantificación descrita para el caso del romero).

#### 1.3.3.3. Extracto de Oliva

Para la cuantificación del HT en el OE, el extracto se disolvió en DMSO en una proporción de 5 mg/mL, filtrando la solución a través de una membrana de nylon de 0,45µm para ser analizada por cromatografía.

El equipo HPLC y las condiciones de análisis fueron idénticas a los mencionadas para el análisis de GSE, la elución fue monitorizada a 280 nm.

La fase móvil para el análisis cromatográfico fue: (A) ácido acético/agua (2.5:97.5) y (B) acetonitrilo. Se empleó un sistema de gradiente lineal desde 95% (A) y 5% (B) a 75% (A) y 25% (B) durante 20 min; cambiando a 50% (A) y (B) en 20 min (40 min, tiempo total); a 20% (A) y 80% (B) en 10 min (50 min, tiempo total), y re-equilibrando finalmente en 10 min (60 min, tiempo total) a la composición inicial de eluyentes.

#### Expresión de resultados

El HT en el OE se identificó por su tiempo de retención cromatográfico (Rt) y por su espectro UV obtenido con el detector de diodos, y fue cuantificado siguiendo el mismo sistema de cálculo antes descrito para el RE. (Benavente-Garcia, Castillo, Lorente, Ortuno, & Del Rio, 2000).

#### 1.3.3.4 Extracto natural rico en tocoferoles

Para la identificación y cuantificación de los distintos isómeros de tocoferol presentes en TOC, el extracto se disolvió en metanol en una concentración de 1 mg/mL.

El equipo de HPLC utilizado fue un Hitachi LaCrom Elite (Merck) equipado con un detector de diodos. La fase estacionaria fue una columna analítica C18 LiChrospher 100 (250x4 mm d.i.) con un tamaño de partícula de 5 µm (Merck, Darmstadt, Alemania). La temperatura se mantuvo a 30 °C. El caudal del flujo fue de 1.5 mL/min, y la elución fue monitoreada a 280 nm.

La fase móvil para el análisis cromatográfico fue: (A) ácido acético/agua (1:99) y (B) metanol. El proceso de elución se inició con una etapa isocrática de 50% (A) y (B) durante 5 min; introduciendo posteriormente un periodo de gradiente lineal de 50% (A) y (B) a 100% (B) en 20 min (25 min, tiempo total); manteniéndose esta composición de forma isocrática durante 10 min (35 min, tiempo total); re-equilibrando luego a la composición inicial de eluyentes en 5 min (40 min, tiempo total).

#### Expresión de resultados

Los distintos isómeros de TOC se identificaron comparando sus tiempos de retención ( $R_t$ ) y sus espectros UV obtenidos con el detector de array de diodos con los de los patrones correspondientes. La cuantificación se realizó empleando la misma sistemática previamente descrita para RE.

## 1.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1.4.1. Antioxidantes de origen sintético

La Tabla 1.1. muestra el contenido absoluto de los principios activos antioxidantes (PAA) de naturaleza sintética utilizados en el presente estudio. Estos datos fueron extraídos de los certificados de análisis facilitados por los fabricantes de dichos antioxidantes.

**Tabla 1.1.** Caracterización de antioxidantes sintéticos.

Sustancia	Principio activo antioxidante	Contenido
BHT	2,6-Di- <i>tert</i> -butyl-4-methylphenol	99.10
BHA	2- <i>tert</i> -butyl-4-hydroxyanisole	99.80
TBHQ	2-(1,1-Dimethylethyl)-1,4-benzenediol	99.85
AP	[(2S)-2-[(2R)-4,5-Dihydroxy-3-oxo-2-furyl]-2-hydroxy-ethyl] hexadecanoate	99.34

Contenido expresado en términos de % de contenido absoluto.

### 1.4.2. Antioxidantes de origen natural

A continuación, se describen los extractos vegetales obtenidos mediante los procesos de extracción previamente descritos (apartado 1.2), así como la cuantificación de PAA de dichos extractos y del extracto natural rico en tocoferoles (TOC), obtenida a partir de los métodos de análisis cromatográfico descritos en apartado 1.3.

#### 1.4.2.1. Extractos de romero

Las extracciones de la hoja de romero se realizaron con acetona, siguiendo las buenas prácticas de fabricación (GMP) y los principios del Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP). Los distintos RE obtenidos (RE1,R2, RE3, RE4 y RE5), que pueden verse en la Figura 1.4, cumplen las especificaciones adecuadas

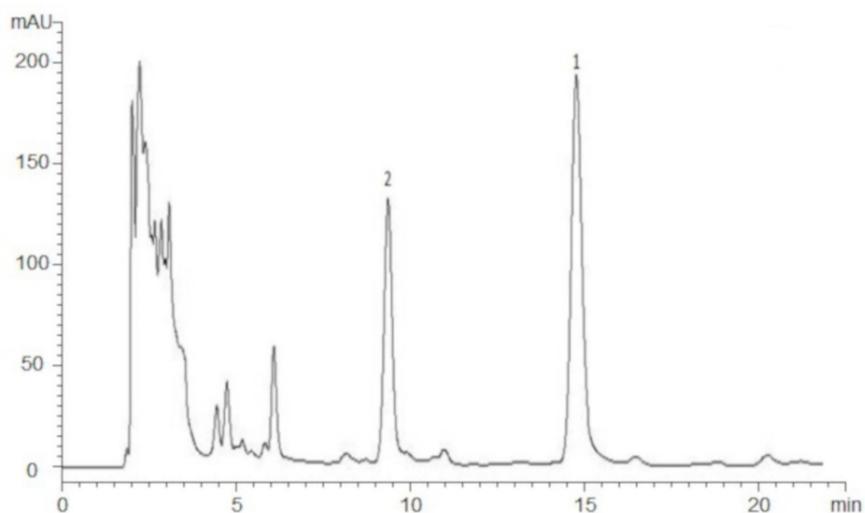
de calidad alimentaria establecidas en el Reglamento (UE) n° 231/2012 de la Comisión Europea, de 9 de marzo de 2012, relativo a las especificaciones de los aditivos alimentarios enumerados en los anexos II y III del Reglamento (CE) n° 1333/2008 (EFSA ANS Panel, 2018).



**Figura 1.4.** Imagen de los distintos extractos de romero (RE1, RE2, RE3, RE4 y RE5) obtenidos mediante los procesos descritos en esta memoria.

Los diterpenos fenólicos, CA y COL, han sido identificados como los principales componentes antioxidantes de los RE, y su presencia y distribución han sido descritas durante el crecimiento de la planta de romero (Birtić, Dussort, Pierre, Bily, & Roller, 2015; del Baño *et al.*, 2003). La Figura 1.5 muestra el cromatograma de HPLC característico de un RE.

Los resultados obtenidos en la cuantificación absoluta de diterpenos CA y COL por HPLC para los cinco RE de nuestro estudio se muestran en la Tabla 1.2.



**Figura 1.5.** Cromatograma HPLC característico de un extracto de romero.

Picos: 1, ácido carnósico; 2, carnosol.

**Tabla 1.2.** Concentración de ácido carnósico y carnosol en los distintos extractos de romero.

Extracto	CA+COL	CA	COL	CA/COL*
RE1	21,31 ± 0,00	5,76 ± 0,00	15,55 ± 0,00	0,37 ± 0,01
RE2	20,75 ± 0,00	15,35 ± 0,00	5,40 ± 0,00	2,84 ± 0,2
RE3	35,75 ± 0,00	34,34 ± 0,00	5,41 ± 0,00	5,60 ± 0,01
RE4	4,53 ± 0,00	3,82 ± 0,00	0,72 ± 0,00	5,34 ± 0,19
RE5	80,81 ± 0,01	75,65 ± 0,01	5,16 ± 0,00	14,66 ± 0,13

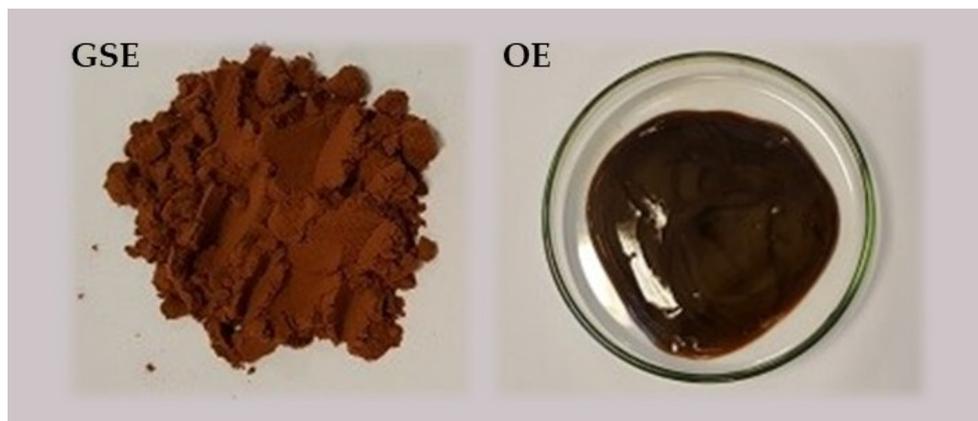
Resultados expresados como media ± SD (n=3) en términos de % de contenido absoluto para CA+COL, CA y COL. \*La ratio CA/COL es un coeficiente, por lo que no tiene unidades.

El contenido total de diterpenos (CA+COL) de los diferentes RE varió de 4,5 a 80,8 %. Además del contenido absoluto, la Tabla 1.2, muestra las diferencias en la relación CA/COL entre los diferentes RE, que oscila entre 0,4 y 14,7.

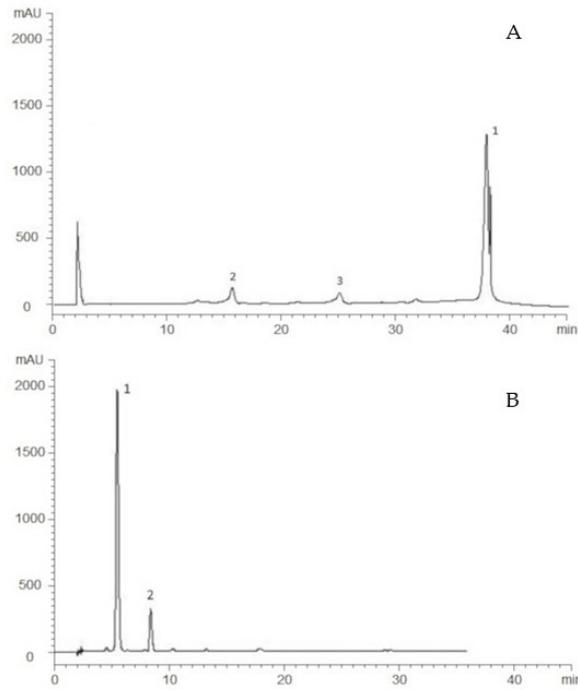
#### *1.4.2.2. Extracto de semilla de uva y extracto de oliva*

Los extractos de semilla de uva y de oliva que se muestran en la Figura 1.6 fueron obtenidos empleando protocolos industriales certificados como Food Safety Certificate ISO 22000:2005 y Certification GMP NFS 173 Food Supplements (FDA). Los métodos específicos de extracción de estos materiales vegetales son los descritos en el apartado 1.2 del presente capítulo.

Una vez obtenidos los extractos vegetales, fueron identificados y cuantificados sus principales principios activos polifenólicos mediante análisis HPLC (metodología descrita en el apartado 1.3 de este capítulo), con el fin de poder comparar las actividades antioxidantes siempre a igual concentración de PAA. La Figura 1.7 muestra los cromatogramas de GSE y OE. Los resultados obtenidos en la cuantificación absoluta de estructuras fenólicas en GSE y OE se reflejan en la Tabla 1.3.



**Figura 1.6.** Imagen de los extractos de semilla de uva (GSE) y Oliva (OE), obtenidos mediante los procesos descritos en esta memoria.



**Figura 1.7.** (A) Cromatograma HPLC de extracto de semilla de uva. Picos: 1, procianidinas de 4 o más unidades de catequina; 2, (+)-catequina; 3, (-)-epicatequina. (B) Cromatograma HPLC de extracto de oliva. Picos: 1, hidroxitirosol; 2, tirosol.

**Tabla 1.3.** Concentración de principios activos antioxidantes en extracto de semilla de uva y extracto de oliva.

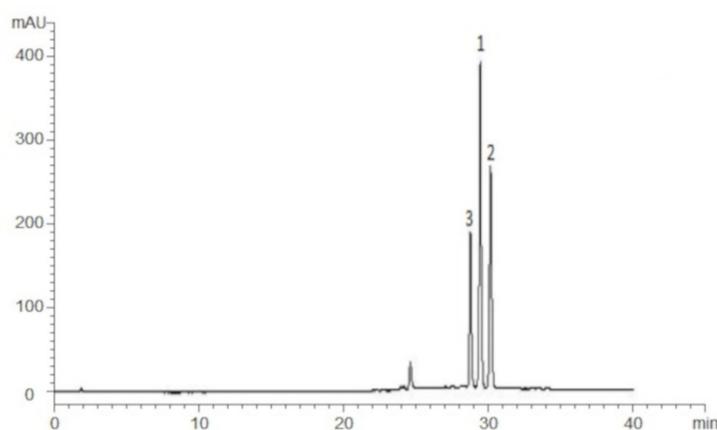
Extracto	Principio Activo	Contenido
GSE	<b>Procianidinas totales</b>	<b>90,15 ± 0,05</b>
	Catequina	0,92 ± 0,01
	Epicatequina	0,85 ± 0,00
	OPCs dímeros y trímeros	3,66 ± 0,02
	OPCs mayores que trímeros	84,72 ± 0,00
OE	<b>Hidroxitirosol</b>	<b>27,80 ± 0,03</b>

Resultados expresados como media ± SD (n=3) en términos de % absoluto.

Se observa que el GSE es el extracto vegetal más rico en polifenoles de nuestro estudio, con un contenido total de procianidinas del 90%, principalmente procianidinas oligoméricas (OPCs) mayores que trómeros. En el caso de OE, el principal principio activo identificado es el HT, cuya riqueza en OE se sitúa en torno al 28%.

#### 1.4.2.3. Extracto natural rico en tocoferoles

Los resultados de la cuantificación de activos de la mezcla comercial de tocoferoles se reflejan en la Tabla 1.4 y la Figura 1.8 muestra su cromatograma HPLC.



**Figura 1.8.** Cromatograma HPLC del extracto natural rico en tocoferoles (TOC). Picos: 1,  $\gamma$ -tocoferol; 2,  $\alpha$ -tocoferol; 3,  $\delta$ -tocoferol.

**Tabla 1.4.** Concentración de principios activos antioxidantes en el extracto natural rico en tocoferoles.

Antioxidante	Principio Activo	Contenido
TOC	<b>Tocoferoles totales</b>	<b>52,96 ± 0,01</b>
	$\gamma$ -Tocoferol	26,17 ± 0,01
	$\delta$ -Tocoferol	10,59 ± 0,00
	$\alpha$ -Tocoferol	16,20 ± 0,13

Resultados expresados como media  $\pm$  SD (n=3) en términos de % absoluto.

### 1.5. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este capítulo concluyen que:

1. Se obtuvieron cinco extractos de romero diferentes a partir de la misma hoja de romero (RE1, RE2, RE3, RE4 y RE5) con un contenido absoluto de diterpenos (ácido carnósico + carnosol) entre un 4 y un 80%. La ratio de diterpenos en cada extracto (ácido carnósico/carnosol) osciló entre 0.4 y 15.
2. Se obtuvieron un extracto de semilla de uva y un extracto de oliva con un contenido total del 90% de procianidinas y 28 % de hidroxitirosol respectivamente.
3. Se cuantificaron los distintos isómeros de tocoferol de del extracto rico en tocoferoles (53% de tocoferoles totales:  $\gamma$ -Tocoferol 26%,  $\delta$ -Tocoferol 11% y  $\alpha$ -Tocoferol 16%).
4. Los cuatro antioxidantes de origen sintético seleccionados presentaron una concentración de sus principios activos antioxidantes superior al 99%.



## Capítulo 2: Capacidad Antirradical frente a DPPH•



## CAPÍTULO 2. CAPACIDAD ANTIRRADICAL FRENTE A DPPH\*

### 2.1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Uno de los ensayos más utilizados para la cuantificación de la actividad antioxidante de extractos vegetales y compuestos simples es el método DPPH (Brand-Williams, Cuvelier, & Berset, 1995; Mishra, Ojha, & Chaudhury, 2012). Descrito por primera vez por Brand-Williams en 1995, este método está basado en la reducción de un radical libre (DPPH<sup>\*</sup>) por un antioxidante. El fruto de esta reacción es un cambio colorimétrico que se monitoriza espectrofotométricamente durante el tiempo necesario hasta que la reacción llegue a su fin. El procedimiento de ensayo original ha sido adoptado en diferentes laboratorios con una amplia variedad de modificaciones, lo que dificulta la comparación de los resultados entre los estudios. En este sentido, la mayoría de los estudios en la literatura se basan en un tiempo de reacción fijo, más que en un tiempo de reacción total, para acelerar el análisis. Este tiempo de reacción puede variar ampliamente: 20 min (Bendif *et al.*, 2017), 30 min (Terpinc, Beznak, & Abramovic, 2009; Y. Zhang *et al.*, 2010) o 60 min (Rašković *et al.*, 2014). Otros autores han extendido el tiempo de reacción hasta 8 horas (Szabo, Radu, Gavrilas, Chambre, & Iditoiu, 2010), 24 horas (Thaipong, Boonprakob, Crosby, Cisneros-Zevallos, & Hawkins Byrne, 2006) e incluso 48 horas (Fukumoto & Mazza, 2000).

Sin embargo, varios autores han observado que la práctica de emplear un tiempo de reacción fijo en la estimación de la actividad antioxidante no tiene necesariamente en cuenta el comportamiento cinético de los compuestos antioxidantes y puede subestimar la actividad antioxidante de los compuestos o extractos de plantas que reaccionan más lentamente con DPPH<sup>\*</sup>. Por esta razón, han recomendado volver al método original, monitorizando la reacción hasta su finalización (Dawidowicz, Wianowska, & Olszowy, 2012; Fadda *et al.*, 2014; Kedare & Singh, 2011; Mishra *et al.*, 2012). Además, se ha descrito que la evaluación completa y precisa de la capacidad antioxidante exige registrar la pérdida de absorbancia constantemente a lo largo del tiempo de reacción en lugar de en un momento concreto (J. Xie & Schaich, 2014).

Los objetivos de este capítulo de la memoria fueron los siguientes:

- Caracterizar las propiedades antirradicales *in vitro* de todos los antioxidantes estudiados en esta memoria.
- Comparar la actividad antirradical de todos los antioxidantes estudiados en esta memoria respecto a la sustancia de referencia Trolox y entre sí, todos ellos a la misma concentración de principio activo antioxidante.
- Intentar establecer una relación estructura-actividad en dicho estudio comparativo.
- Evaluar la importancia de la relación entre las concentraciones de ácido carnósico y carnosol para la actividad antioxidante de los distintos extractos de romero de este estudio.

Para los objetivos mencionados, se utilizó el método DPPH con algunas modificaciones, ya que no se fijó un tiempo de medida determinado en el ensayo, sino que para cada determinación se utilizó el tiempo necesario para completar la reacción en cada caso, es decir hasta llegar a la meseta.

## 2.2. MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.2.1. Material

#### 2.2.1.1. Reactivos

- Ácido 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (D9132- Sigma Aldrich),
- Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-croman-2-carboxílico (238813-Sigma Aldrich)
- Dimetilsulfóxido (131954.1611-PanReac)

#### 2.2.1.2. Antioxidantes

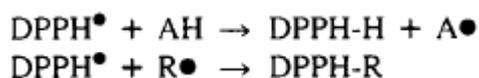
Todos los antioxidantes estudiados en la presente memoria se obtuvieron a partir de suministradores especializados y contrastados en el ámbito de la industria alimentaria, estando todos ellos aprobados y certificados para uso alimentario. El butilhidroxianisol fue adquirido de Dupont-Danisco-Dow Chemical (Copenhague, Dinamarca), el butilhidroxitolueno de Indukern (Barcelona, España), la *terc*-butilhidroquinona y el palmitato de ascorbilo de Dongguan Green Food Technology (Guangdong, China). La mezcla comercial de tocoferoles fue suministrada por la compañía Ingrenat (Murcia, España).

En relación con los extractos vegetales estudiados, tanto los cinco extractos de romero utilizados, como el extracto de semilla de uva y extracto de oliva, fueron obtenidos en los laboratorios de Nutrafur-IFF-Natural Product Solutions (Murcia, España), siguiendo los protocolos industriales de trabajo homologados por el Dpto. de Garantía de Calidad de la Compañía y certificados como Food Safety Certificate ISO 22000:2005 y Certification GMP NFS 173 Food Supplements (FDA). (Ver proceso de extracción y caracterización en capítulo 1).

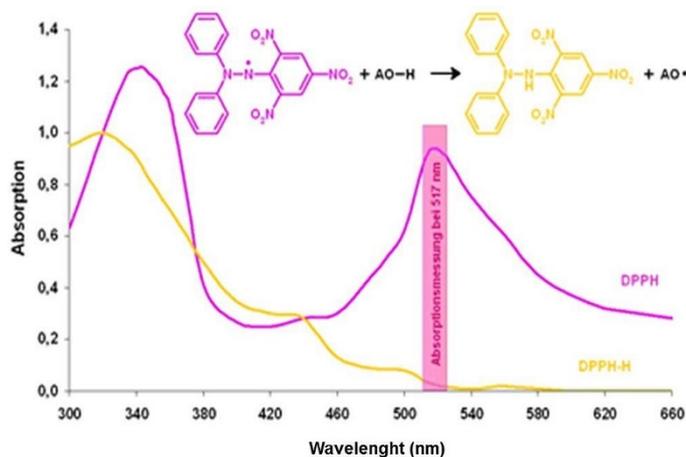
## 2.2.2. Método

### 2.2.2.1. Fundamento

El DPPH• es un radical estable en solución, tiene un color púrpura y absorbe a 515 nm. La base de este ensayo consiste en la capacidad del DPPH• de aceptar un átomo de hidrógeno de un compuesto antioxidante (AH) o de una especie radical (R•), como muestra la siguiente reacción:



Debido a esta reacción, el color púrpura cambia a amarillo y la absorbancia a 515 nm disminuye (Figura 2.1). Esta disminución se monitoriza espectrofotométricamente hasta que la reacción alcanza el estado estacionario que se denomina "meseta". Por diferencia de absorbancia se determina la actividad antioxidante del compuesto analizado.



**Figura 2.1.** Representación gráfica de la reacción de reducción del radical DPPH•. Fuente imagen: Pérez & FregosoAguilar, 2013.

### 2.1.2.2. Procedimiento

Para determinar la actividad antioxidante *in vitro* de las sustancias estudiadas en este trabajo se hicieron modificaciones del método DPPH original de Brand-Williams *et al.* (Brand-Williams *et al.*, 1995), adaptando dicho método a un lector de placas que permitiera registrar de manera automática la variación de la absorbancia durante todo el tiempo de reacción (hasta la meseta) en un gran número de muestras simultáneamente (Bendif *et al.*, 2017).

Para evitar las pérdidas por evaporación debidas al largo tiempo de reacción necesario para algunos antioxidantes, se utilizó DMSO como disolvente tanto para preparar las muestras como para la solución de radical DPPH (Hijazi *et al.*, 2017; Jabbari & Gharib, 2012).

Por cada sustancia antioxidante analizada se prepararon diluciones a siete concentraciones diferentes. El rango de concentración adecuado de cada antioxidante se ajustó para obtener valores iniciales y finales dentro del rango de precisión del espectrofotómetro (Sharma & Bhat, 2009). La Tabla 2.1 muestra el rango de concentración analizado para cada antioxidante.

La dilución de DPPH• fue preparada diariamente a una concentración de 322  $\mu\text{M}$  (166  $\mu\text{M}$  concentración en pocillo). Para producir la reacción de reducción del radical, 100  $\mu\text{l}$  de la dilución de DPPH• y 100  $\mu\text{l}$  de las distintas diluciones de cada antioxidante se agregaron a distintos pocillos en una microplaca negra de ensayo de 96 pocillos con fondo plano transparente, BD Falcon (Figura 2.2).



**Figura 2.2.** Microplaca cargada con muestras de antioxidantes a distintas concentraciones y DPPH•.

Acto seguido se monitorizó la disminución de la absorbancia en cada pocillo en un lector de placas Synergy HTX Multimode reader (Biotek Instruments) a 515 nm frente a DMSO como blanco. La absorbancia se midió a tiempo 0 (0 min) y cada 1, 2 ó 5 min (dependiendo del tiempo de reacción total de cada sustancia analizada) hasta que la reacción alcanzó una meseta, considerada en el momento en que la diferencia entre dos lecturas de absorbancia subsiguientes fue  $\leq 0.003$ , es decir, la repetibilidad fotométrica del instrumento en uso. La absorbancia registrada en este punto fue la absorbancia final (Af).

**Tabla 2.1.** Rangos de concentraciones empleadas para cada principio activo antioxidante en el ensayo de capacidad antirradical frente a DPPH<sup>•</sup>.

Antioxidante	Rangos de concentración en pocillo de las diluciones analizadas	
	$\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{mol/mL}$
BHT	12-18	40-60
BHA	7-14	40-75
TBHQ	7-10	40-60
AP	20-27	50-65
RE1	7-10	20-40
RE2	5-8	15-25
RE3	6-10	15-30
RE4	5-10	15-30
RE5	7-10	15-30
TOC	20-35	50-90
GSE	7-10	4-6
OE	4-7	25-50
TLX	10-15	35-60

Para conocer la absorbancia inicial ( $A_0$ ), se añadieron 100  $\mu\text{l}$  de la dilución DPPH• y 100  $\mu\text{l}$  DMSO puro (sin muestra).  $A_0$  fue también monitorizado a lo largo de toda la reacción. De esta manera, se puede descartar cualquier posible disminución de la absorbancia que no sea la debida a la actividad del antioxidante. El ensayo se realizó por triplicado para cada antioxidante y concentración ensayada.

### 2.1.2.3. Expresión de resultados

La actividad antioxidante fue definida por Brand-Williams *et al.* (Brand-Williams *et al.*, 1995) como la cantidad de sustancia necesaria para disminuir la concentración inicial de DPPH• en un 50% (Efficient Concentration =  $EC_{50}$ ), expresada en moles de PAA/mol DPPH•. Cuanto menor sea el valor del  $EC_{50}$ , mayor será la actividad antioxidante de la sustancia. Dado que este concepto puede generar confusión, utilizamos el término Antirradical Power ( $ARP = 1/EC_{50}$ ): cuanto mayor sea el ARP, mayor será la actividad antioxidante (Brand-Williams *et al.*, 1995; Mishra *et al.*, 2012).

Para todos los compuestos y extractos estudiados fue posible calcular la concentración molar, según el peso molecular y la proporción relativa (contenido absoluto) de cada PAA. La concentración molar de GSE se determinó utilizando la media ponderada de la masa molecular de los diferentes compuestos (monómeros, dímeros, trímeros y polímeros más largos que los trímeros) presentes en GSE. Los polímeros más largos que los trímeros se consideraron de manera global como hexámeros (Castillo *et al.*, 2000a).

Para poder realizar comparativas en cuanto a la aplicabilidad en la industria alimentaria de los distintos antioxidantes estudiados, se calculó también el  $EC_{50}$ , y su correspondiente ARP, en términos de concentración de masa ( $\mu\text{g}$  de PAA /mL solvente).

El cálculo del  $EC_{50}$  se realiza como queda descrito en el apartado de resultados.

### 2.2.3. Método de análisis estadístico

Con el fin de definir si las diferencias en cuanto a la actividad antirradical de las distintas sustancias analizadas eran significativas, se evaluó la diferencia estadística de la actividad antirradical entre cada sustancia y entre grupos de antioxidantes. Para el análisis por grupos, los antioxidantes se dividieron en tres grupos del siguiente modo: un primer grupo que incluyó todos los antioxidantes de origen sintético (BHA, BHT, TBHQ y AP), un segundo grupo con todos los extractos de romero (RE1, RE2, RE3, RE4 y RE5), y un tercer grupo donde se incluyeron el resto de los extractos naturales (GSE, OE y TOC).

Se realizaron las estadísticas descriptivas de los valores de cada parámetro de interés ( $EC_{50}$   $\mu\text{mol PAA}/\mu\text{mol DPPH}^*$ ,  $EC_{50}$   $\mu\text{g PAA}/\text{mL}$ , ARP  $\mu\text{mol PAA}/\mu\text{mol DPPH}^*$ , ARP  $\mu\text{g PAA}/\text{mL}$ ) para cada antioxidante. Se analizó la variabilidad relativa entre mediciones de cada parámetro mediante la descomposición de su varianza y se observó que el parámetro ARP  $\mu\text{g PAA}/\text{mL}$  era el que menos variabilidad entre mediciones mostraba, por este motivo se decidió realizar los demás análisis sobre este parámetro.

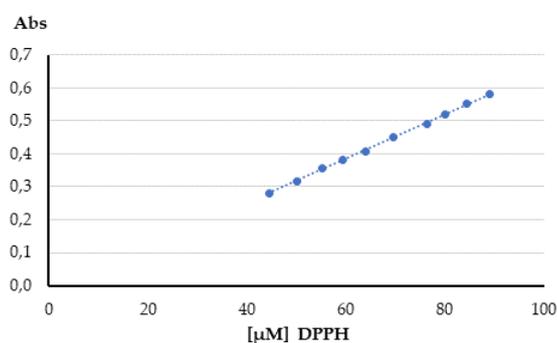
Para el análisis comparativo del valor ARP ( $\mu\text{g PAA}/\text{mL}$ ) entre antioxidantes se realizó un modelo de regresión lineal de ARP ( $\mu\text{g PAA}/\text{mL}$ ) sobre la variable antioxidante como factor y se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk para comprobar que los residuos no se desviaban excesivamente de la normalidad. Posteriormente se hicieron comparaciones "post-hoc" entre medias de cada par de antioxidantes con la penalización de Tukey por múltiples comparaciones.

Para el análisis comparativo del valor ARP ( $\mu\text{g PAA}/\text{mL}$ ) entre grupos se realizó un modelo de regresión lineal de ARP ( $\mu\text{g PAA}/\text{mL}$ ) sobre la variable antioxidante y grupo como factor y usamos la prueba de Shapiro-Wilk para comprobar que los residuos no se desviaban excesivamente de la normalidad. Posteriormente se hicieron comparaciones "post-hoc" entre medias de cada par de antioxidantes con la penalización de Tukey por múltiples comparaciones.

## 2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 2.3.1. Cálculo de EC<sub>50</sub>

Para calcular el valor EC<sub>50</sub> de cada sustancia analizada, se realizó una recta de calibración de DPPH• (Figura 2.3).

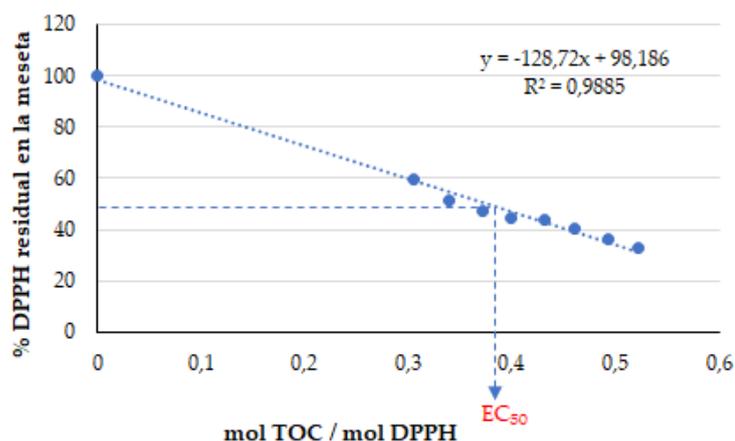


**Figura 2.3.** Recta de calibrado de DPPH•.

A partir de la recta de calibración se determinó por regresión lineal ( $r=0.999$ ) la ecuación de la recta:

$$\text{Abs}_{515\text{nm}} = 0.0068 \times [\text{DPPH}^\bullet] - 0.0201$$

Empleando esta ecuación, a partir de los valores de absorbancia A<sub>0</sub> y A<sub>f</sub> de cada pocillo, se pudo determinar la concentración inicial y final de DPPH• en el medio. De este modo pudo calcularse el porcentaje de DPPH• remanente en la meseta de la reacción para cada concentración de cada antioxidante. Este dato se representó gráficamente en función de la ratio molar de antioxidante respecto a la concentración de DPPH• y, a partir de la curva generada para cada antioxidante, pudo determinarse la concentración sustancia necesaria para reducir el 50% del DPPH• presente en el medio (EC<sub>50</sub>). En la Figura 2.4 se expone un ejemplo de esta representación gráfica para uno de los ensayos realizados con el antioxidante TOC.



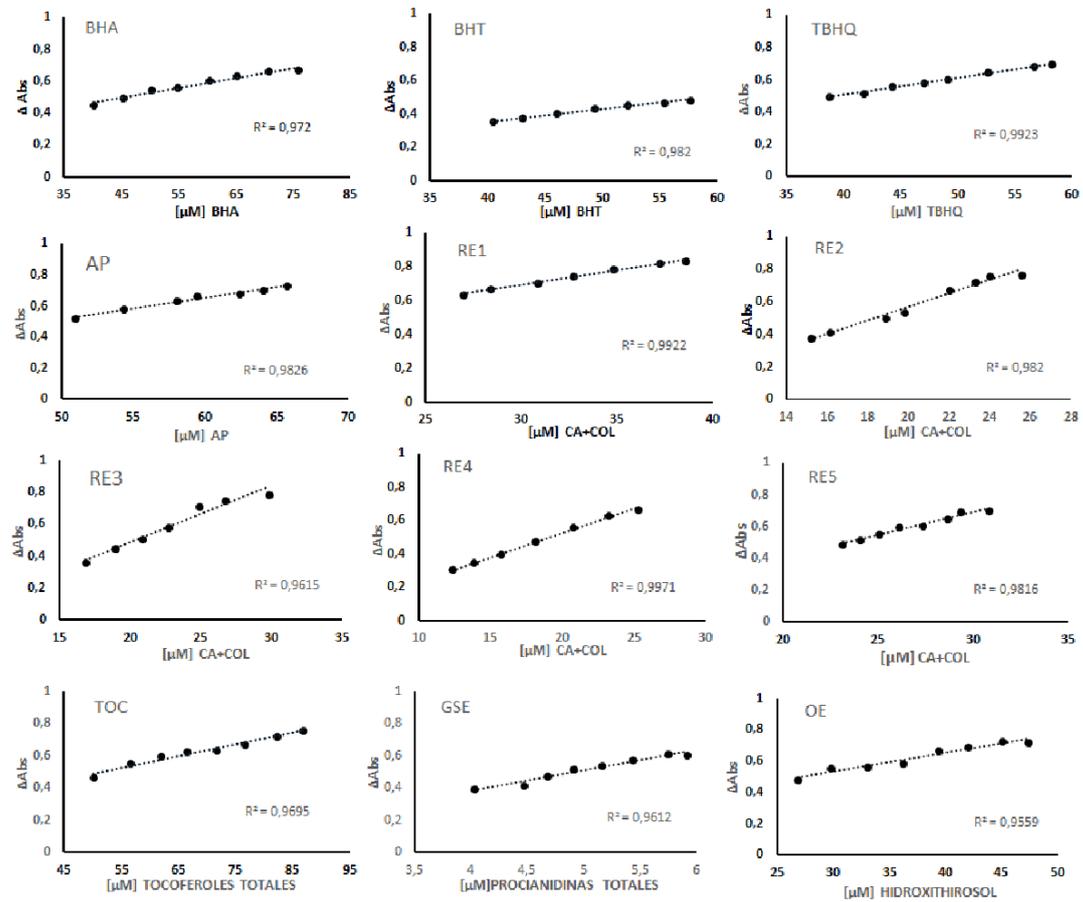
**Figura 2.4.** Representación gráfica de la reducción de DPPH\* en función de n° moles tocóferoles (TOC)/n° moles DPPH\*.

### 2.3.2. Capacidad estabilizadora del radical DPPH: relación molecular

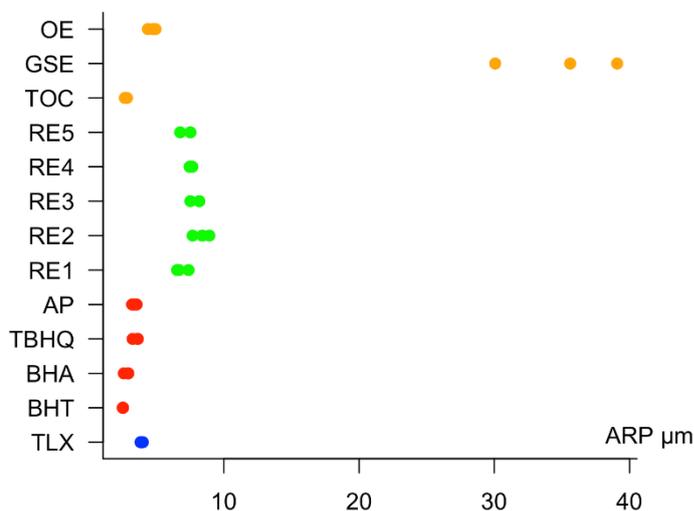
En la Figura 2.5 se observa que todos los antioxidantes estudiados muestran una capacidad antirradical frente a DPPH\* dependiente de la concentración de PAA.

La Figura 2.6 y la Tabla 2.2 reflejan el valor de ARP (para cada una de las sustancias antioxidantes analizadas) obtenido a partir del valor EC<sub>50</sub> expresado como  $\mu\text{mol}$  de PAA/  $\mu\text{mol}$  de DPPH\*, tal como lo define Brand-Williams *et al.* (1995). El propósito de expresar el valor ARP en estos términos es establecer una relación molecular estequiométrica entre el antioxidante y el radical DPPH, aunque esto sólo proporcionará un valor aproximado en el caso de extractos vegetales y TOC, ya que estos no son moléculas puras. En este sentido, observamos que el grupo de extractos vegetales en general presenta mayor capacidad antirradical que los antioxidantes sintéticos estudiados, TOC y TLX.

Entre los extractos vegetales, el GSE es el que muestra una mayor capacidad para reducir el DPPH\*, seguido de todos los RE. También cabe destacar la buena capacidad antirradical del OE en comparación con el TLX, los antioxidantes sintéticos y TOC.



**Figura 2.5.** Representación gráfica de la actividad antirradical frente a DPPH\* para las muestras estudiadas. Se representa el incremento de la absorbancia a 515 nm en el eje de ordenadas, frente a la concentración de principio activo antioxidante de cada sustancia en el de abscisas expresada como concentración  $\mu$ molar.



**Figura 2.6.** Representación gráfica de los valores ARP ( $\mu\text{mol PAA}/\mu\text{mol DPPH}^*$ ) obtenidos para cada antioxidante. Los puntos representados en la misma línea horizontal expresan los resultados de las tres repeticiones realizadas para cada sustancia analizada.

**Tabla 2.2.** Valores de ARP ( $\mu\text{mol PAA}/\mu\text{mol DPPH}^*$ )

Antioxidante	ARP
BHA	2,81 ± 0,18
BHT	2,53 ± 0,01
TBHQ	3,50 ± 0,22
AP	3,38 ± 0,17
TOC	2,74 ± 0,08
RE-1	6,87 ± 0,46
RE-2	8,34 ± 0,62
RE-3	7,96 ± 0,38
RE-4	7,54 ± 0,11
RE-5	7,27 ± 0,44
GSE	34,92 ± 4,55
OE	4,69 ± 0,29
TLX	3,90 ± 0,09

ARP ( $\mu\text{mol PAA}/\mu\text{mol DPPH}^*$ ) expresados como media  $\pm$  SD (n=3).

Si ordenamos los valores de ARP ( $\mu\text{mol PAA}/\mu\text{mol DPPH}^*$ ) de mayor a menor, el orden de capacidad antirradical sería el siguiente:

GSE> RE2> RE3> RE4> RE5> RE1> OE> TLX> TBHQ> AP> BHA> TOC> BHT

Estos resultados, desde un punto de vista estructural, parecen reflejar fielmente los mecanismos generales de la actividad de captación de radicales libres. El antioxidante más activo, GSE (ARP 34.9), se compone mayormente de estructuras flavonoides como las catequinas (flavan-3-ol), especialmente en su forma polimerizada (procianidinas) (ver Figura 2.7). Estas moléculas de naturaleza polifenólica incluyen estructuras dihidroxi (catecol) y trihidroxi (ácido gálico) capaces de eliminar los radicales libres del medio, así como un gran número de dobles enlaces conjugados y grupos carbonilo en su esqueleto molecular, capaces de estabilizar los radicales polifenólicos que se generan.

Los distintos RE presentan un ARP ( $\mu\text{mol PAA}/\mu\text{mol DPPH}^*$ ) en el rango de 7,2 a 8,3. El CA y el COL son también compuestos polifenólicos de naturaleza terpenoide (diterpenos), lo que ya les confiere actividad antioxidante. Si se tiene en cuenta además la presencia de un grupo catecol en sus estructuras (ver Figura 2.7). y, en el caso del CA, de un grupo carboxilo, es fácil entender por qué estos compuestos muestran una capacidad de captación de radicales libres tan alta.

Del resto de los compuestos estudiados, el único que presenta un valor de ARP ( $\mu\text{mol PAA}/\mu\text{mol DPPH}^*$ ) superior a 4,0 es el OE probablemente debido, a pesar de su estructura monofenólica (ver Figura 2.7), a la presencia de un grupo catecol en su esqueleto molecular. El resto de los compuestos antioxidantes sintéticos (BHA, BHT, TBHQ y AP), y el TLX, presentan valores de ARP ( $\mu\text{mol PAA}/\mu\text{mol DPPH}^*$ ) inferiores a 4,0 y en el rango de 2,5 a 3,9.

Como complemento a las consideraciones anteriores, los autores del primer artículo en el que se realizó un estudio comparativo de las actividades antioxidantes de varios compuestos utilizando el método DPPH, concluyeron: "...it is evident that the interaction of a potential antioxidant with DPPH\* depends on its structural conformation. Certain compounds react very rapidly with the DPPH\* reducing a number of DPPH\* molecules corresponding to the number of

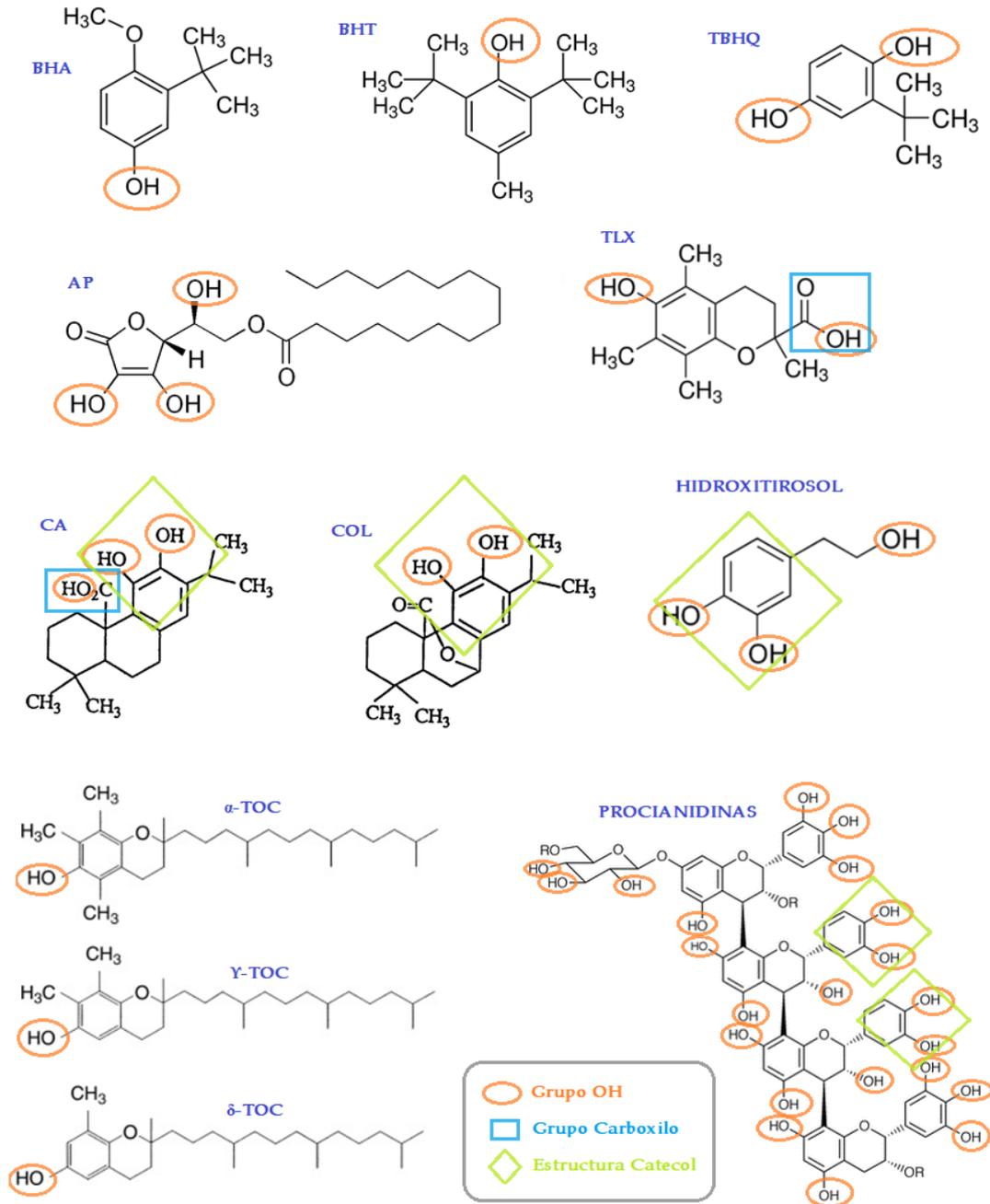
available hydroxyl groups. However, for the majority of the compounds tested the mechanism is more complex" (Brand-Williams *et al.*, 1995)(p.30). Nuevamente, basándonos en el orden de actividad obtenido en función del valor de ARP ( $\mu\text{mol PAA}/\mu\text{mol DPPH}^*$ ), incluyendo el número de grupos hidroxilo disponibles y otras consideraciones estructurales complementarias en estos grupos, obtenemos consistentemente los siguientes resultados:

GSE (más de 30 OH) > RE (3 OH, grupo catechol y grupo carboxilo) > OE (3 OH, grupo catecol y grupo alcohol) > TLX (2 OH, grupo carboxilo y grupo alcohol) > TBHQ (2 OH, no estructura catecol) > AP (3 OH, no estructura fenólica) > BHA (1 OH) > TOC (1 OH) > BHT (1 OH). (Ver Figura 2.7).

A pesar de estas interesantes y coherentes relaciones estructura-actividad, es evidente que los mecanismos de reducción de  $\text{DPPH}^*$ , así como sus modelos cinéticos, son complejos, particularmente si se considera en detalle la gran heterogeneidad y complejidad de las estructuras moleculares de los antioxidantes más ampliamente utilizados en aplicaciones alimentarias.

### 2.3.3. Capacidad estabilizadora del radical DPPH: eficacia comparativa.

Como se menciona anteriormente, es interesante comparar todos los antioxidantes utilizados en la industria alimentaria para evaluar su eficacia relativa (mg frente a mg). En consecuencia, el  $\text{EC}_{50}$  también fue expresado en términos de  $\mu\text{g PAA}/\text{mL}$  solvente ( $\mu\text{g}/\text{mL}$  en adelante en la discusión de este capítulo) y se calcularon también los correspondientes valores de ARP, estos se muestran representados en la Figura 2.8 y la Tabla 2.3



**Figura 2.7.** Análisis estructural de los principios activos antioxidantes estudiados en el ensayo de capacidad antirradical frente a DPPH•.

**Tabla 2.3.** Valores de ARP ( $\mu\text{g PAA/mL}$  disolvente)

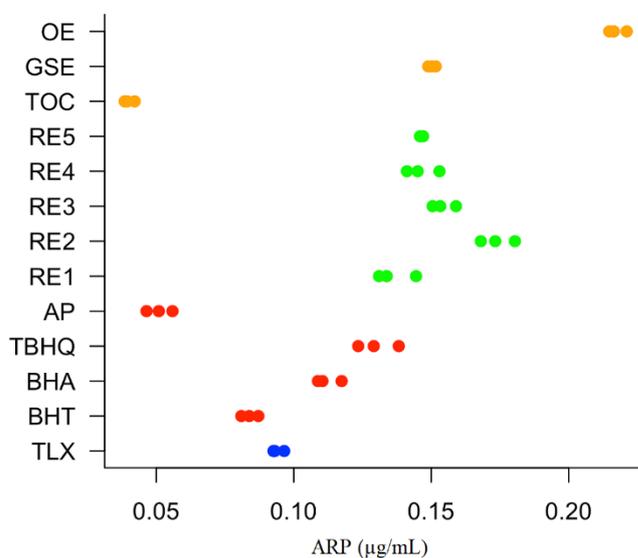
Antioxidante	ARP
BHA	0,11 $\pm$ 0,00
BHT	0,08 $\pm$ 0,00
TBHQ	0,13 $\pm$ 0,01
AP	0,05 $\pm$ 0,00
TOC	0,04 $\pm$ 0,00
RE-1	0,14 $\pm$ 0,01
RE-2	0,17 $\pm$ 0,01
RE-3	0,15 $\pm$ 0,00
RE-4	0,15 $\pm$ 0,01
RE-5	0,15 $\pm$ 0,00
GSE	0,15 $\pm$ 0,00
OE	0,22 $\pm$ 0,00
TLX	0,09 $\pm$ 0,00

ARP ( $\mu\text{g PAA/mL}$  disolvente) expresados como media  $\pm$  SD (n=3).

Observamos en la Figura 2.8 que el antioxidante con un valor de ARP más alto fue el OE. Por debajo del OE se encuentra el grupo de los cinco RE junto con el GSE y seguido de cerca por el TBHQ. En tercer lugar, con menor valor de ARP, encontramos el resto de antioxidantes sintéticos, el control TLX y TOC, que fue la sustancia que mostró menor valor de ARP del conjunto de los antioxidantes estudiados.

Los resultados obtenidos apuntan a un orden de eficacia muy similar al previamente descrito al comparar los valores de ARP expresados en términos de  $\mu\text{mol PAA}/\mu\text{mol DPPH}^*$  pero con ciertas diferencias, especialmente en el caso de compuestos en los que el peso molecular real puede no ser fácil de establecer con precisión, como en el caso de GSE (mayor Pm de PAA) y OE (menor Pm de PAA). La actividad antioxidante de todas las sustancias analizadas ordenadas de mayor a menor valor de ARP ( $\mu\text{g /mL}$ ) sería:

OE> RE2> RE3> GSE> RE5> RE4> RE1> TBHQ> BHA> TLX> BHT> AP> TOC



**Figura 2.8.** Representación gráfica descriptiva de los valores ARP ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) obtenidos para cada antioxidante. Los puntos representados en la misma línea horizontal expresan los resultados de las tres repeticiones realizadas para cada sustancia analizada.

Para evaluar la significancia estadística de las diferencias en los resultados de ARP ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) obtenidos para cada antioxidante, se realizaron los siguientes análisis comparativos entre sustancias (por pares):

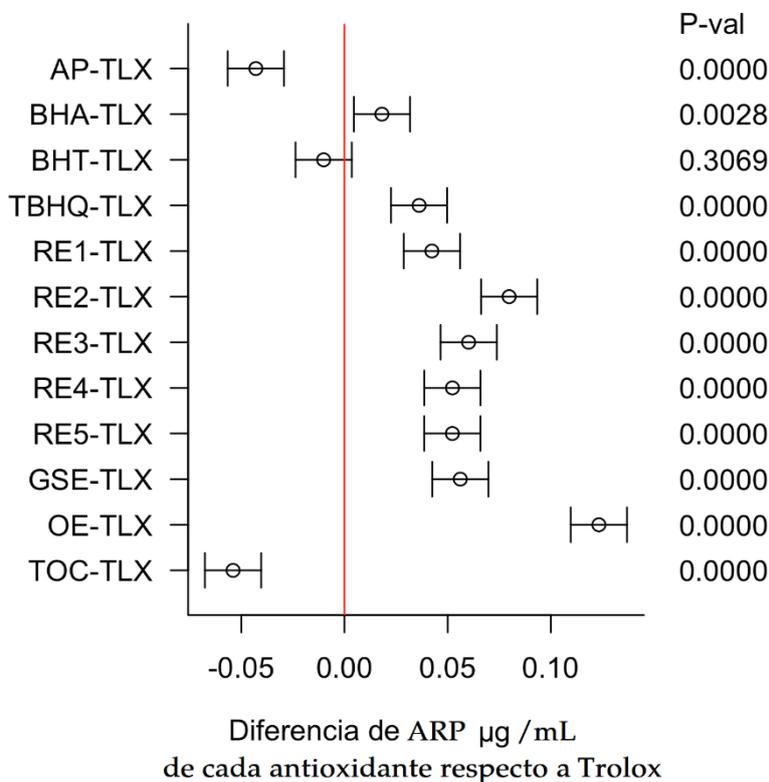
- 1- Análisis comparativo de cada sustancia frente al control TLX.
- 2- Análisis comparativo de las medias de los tres grupos de antioxidantes: sintéticos, romeros y otros naturales.
- 3- Análisis comparativo de las distintas sustancias dentro de cada uno de los grupos de antioxidantes.
- 4- Análisis comparativo entre sustancias de distintos grupos de antioxidantes.

Los resultados obtenidos en los análisis comparativos descritos se representan gráficamente en las imágenes que exponemos a continuación (Figuras 2.9, 2.10, 2.11, 2.12, 2.13 y 2.14). En estas gráficas se representa en la columna de la

izquierda cada par de sustancias que se comparan. En el eje de ordenadas se representa la diferencia del valor ARP ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) de cada par de sustancias comparadas. Cada diferencia entre pares se representa mediante una barra con un punto central. El punto indica la diferencia media que existe entre el valor ARP ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) de los antioxidantes comparados y cada barra muestra el intervalo de confianza al 95% de dicha diferencia. Si la diferencia entre ambos es negativa se representa a la izquierda del valor cero (línea roja) e indica que el valor ARP ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) del primer antioxidante que aparece en la columna de la izquierda, es menor que el antioxidante con el cual se le compara, es decir, el siguiente que aparece en ese par. En cambio, cuando la diferencia de ARP ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) entre las sustancias comparadas es un valor positivo, este se representa a la derecha de la línea roja e indica que el valor para el primer antioxidante es mayor que el del segundo, con el que se le compara. Cuanto más alejada se encuentre cada barra de la línea roja (que representa diferencia cero entre valores), más significativa es la diferencia hallada entre los valores ARP ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) del par de sustancias comparadas. En la columna de la derecha se describe el p-valor para cada una de las comparaciones.

#### *2.3.3.1. Comparativa de ARP ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) de cada antioxidante frente al Trolox*

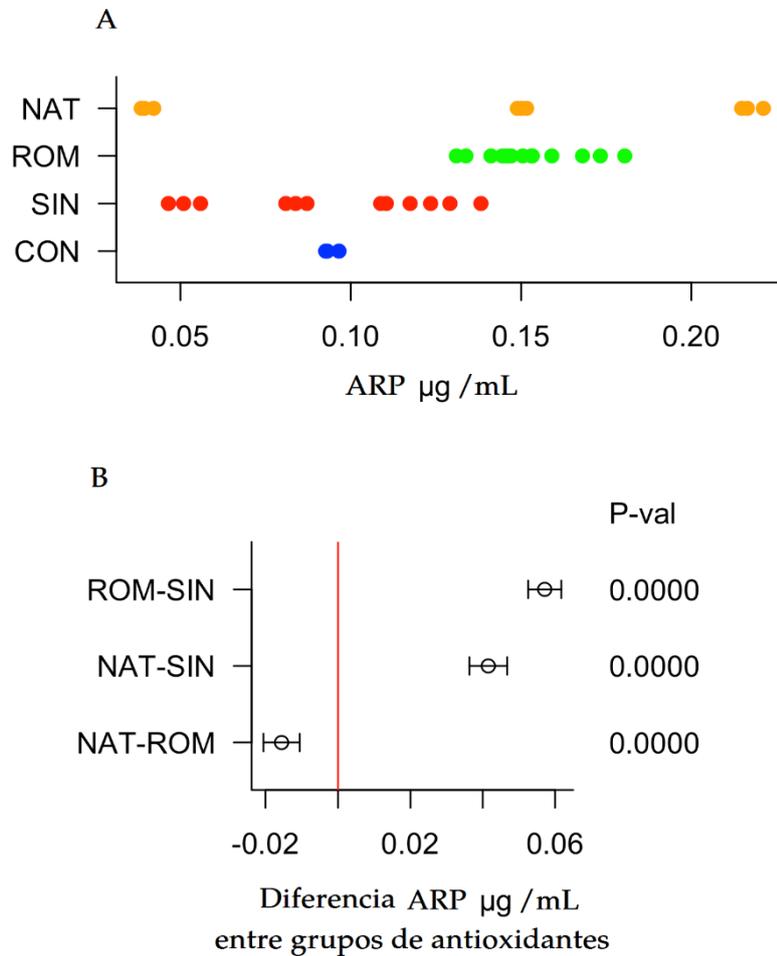
Al comparar el valor de ARP ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) de cada sustancia analizada respecto al control TLX (Figura 2.9) observamos que sólo TOC y AP muestran un valor ARP significativamente inferior que el TLX ( $p < 0,0001$ ). El BHT no muestra diferencia estadísticamente significativa respecto al TLX. El BHA ( $p < 0,005$ ) y el resto de los antioxidantes ( $p < 1e-04$ ) muestran una capacidad antioxidante significativamente mayor que el TLX.



**Figura 2.9.** Análisis comparativo de ARP ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) de cada antioxidante frente al control Trolox (TLX).

### 2.3.3.2. Comparativa de ARP ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) medio entre grupos de antioxidantes

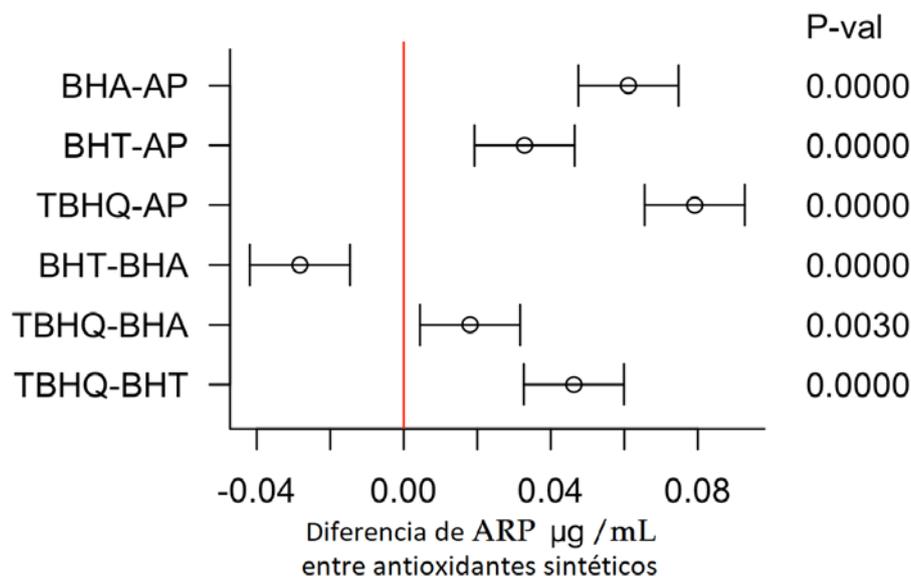
Al comparar el valor de ARP ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) medio de cada grupo de antioxidantes (Figura 2.10) observamos que el grupo de RE muestra una actividad antirradical frente a DPPH\* significativamente superior que el grupo de los antioxidantes sintéticos ( $p < 1e-04$ ) y que el resto de los antioxidantes naturales ( $p < 1e-04$ ). El grupo que comprende el resto de los antioxidantes naturales muestra también un valor ARP ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) medio significativamente superior ( $p < 1e-04$ ) que el grupo de antioxidantes sintéticos. Al igual que hemos visto en la comparativa de estos antioxidantes a nivel molecular, los antioxidantes de origen natural, como grupo, presentan una mayor capacidad antirradicalaria frente a DPPH\* que los de origen sintético, cuando se comparan a igual concentración de PAA.



**Figura 2.10.** A) Descriptiva de valores medios de ARP ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) por grupos de antioxidantes. B) Análisis comparativo del valor medio de ARP ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) de cada grupo de antioxidantes: SIN (antioxidantes sintéticos), ROM (extractos de romero), NAT (otros antioxidantes naturales), CON (control: Trolox).

### 2.3.3.3. Comparativa de ARP ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) en cada grupo de antioxidantes

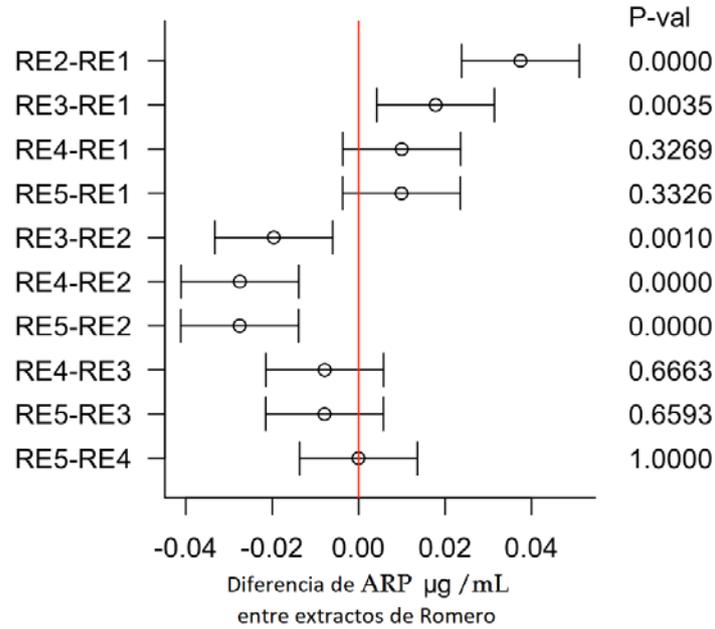
A continuación, describimos las comparativas de los valores ARP ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) dentro de cada grupo de antioxidantes: sintéticos, romeros y naturales.



**Figura 2.11.** Análisis comparativo de ARP ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) dentro del grupo de antioxidantes de origen sintético.

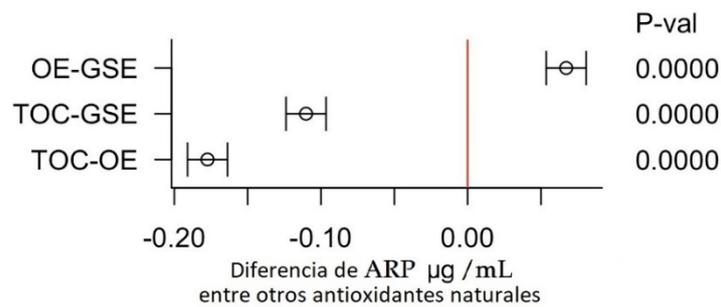
La Figura 2.11 describe las diferencias que existen en el valor de ARP dentro del grupo de antioxidantes sintéticos. TBHQ es el que muestra mayor capacidad antioxidante dentro de este grupo, seguido del BHA ( $p < 0,01$ ), BHT ( $p < 1e-04$ ) y, por último, AP ( $p < 1e-04$ ).

Dentro del grupo de los extractos de romero (Figura 2.12) observamos que todos ellos muestran un valor de ARP ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) similar, comprendido entre 0,14 y 0,17. Solo RE2 muestra una capacidad antioxidante significativamente mayor que RE3 ( $p < 0,001$ ), RE5 ( $p < 1e-04$ ), RE4 ( $p < 1e-04$ ) y RE1 ( $p < 1e-04$ ).



**Figura 2.12.** Análisis comparativo de ARP ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) dentro del grupo de los extractos de romero.

Al agrupar el resto de los antioxidantes de origen natural y compararlos entre ellos (Figura 2.13) se aprecia como EO presenta un ARP ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) significativamente mayor que GSE ( $p < 1e-04$ ) y este último a su vez es significativamente mayor que el valor ARP ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) de TOC ( $p < 1e-04$ ).



**Figura 2.13.** Análisis comparativo de ARP ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) dentro del grupo de otros antioxidantes naturales.

### 2.3.3.3. Comparativa de ARP ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) entre sustancias de distintos grupos

La Figura 2.14 describe las diferencias en los valores ARP ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) de las sustancias pertenecientes a los distintos grupos de antioxidantes. Como ayuda para describir los resultados de esta figura con mayor claridad, volvemos a reflejar en este punto el orden decreciente de las sustancias estudiadas de mayor a menor valor de ARP ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) (orden ya descrito en este mismo apartado 2.3.3; pag. 148): OE> RE2> RE3> GSE> RE5> RE4> RE1> TBHQ> BHA> TLX> BHT> AP> TOC.

Observamos que el OE, que es la sustancia que mayor capacidad antirradical mostró frente al DPPH\*, muestra diferencias significativas ( $p < 1e-04$ ) en el valor ARP ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) al compararlo con valor ARP ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) del resto de las antioxidantes estudiados en nuestro trabajo.

Tras el OE, las siguientes sustancias que muestran mayor capacidad antioxidante son el grupo de RE, el GSE y el TBHQ con un valor ARP ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) que osciló entre 0,13 y 0,17. Observamos que el GSE presenta un valor ARP ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) significativamente superior que RE1 ( $p < 0,05$ ) y TBHQ ( $p > 1e-03$ ), pero significativamente inferior ( $p < 1e-03$ ) que RE2. Sin embargo, no muestra diferencias estadísticas significativas respecto a los valores ARP ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) de los extractos RE3, RE4 y RE5.

Al comparar el TBHQ, que es el antioxidante de origen sintético que muestra mayor valor ARP ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) con los distintos RE observamos que la diferencia de sus ARP ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) es estadísticamente significativa con respecto a RE2 ( $p < 1e-04$ ), que es el RE que mayor capacidad antioxidante manifestó, RE3 ( $p < 1e-03$ ), RE4 y RE5 ( $p < 0,05$ ). Sin embargo, la diferencia estadística de TBHQ respecto al RE1, que es el RE que menor capacidad antioxidante mostró, no es significativa.

El extracto TOC, es la sustancia que menos capacidad antirradical frente al DPPH\* mostró en nuestros ensayos. El valor ARP ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) obtenido para TOC fue significativamente inferior ( $p < 1e-04$ ) al valor hallado para el resto de las sustancias analizadas, a excepción del AP, cuya diferencia no fue estadísticamente significativa.

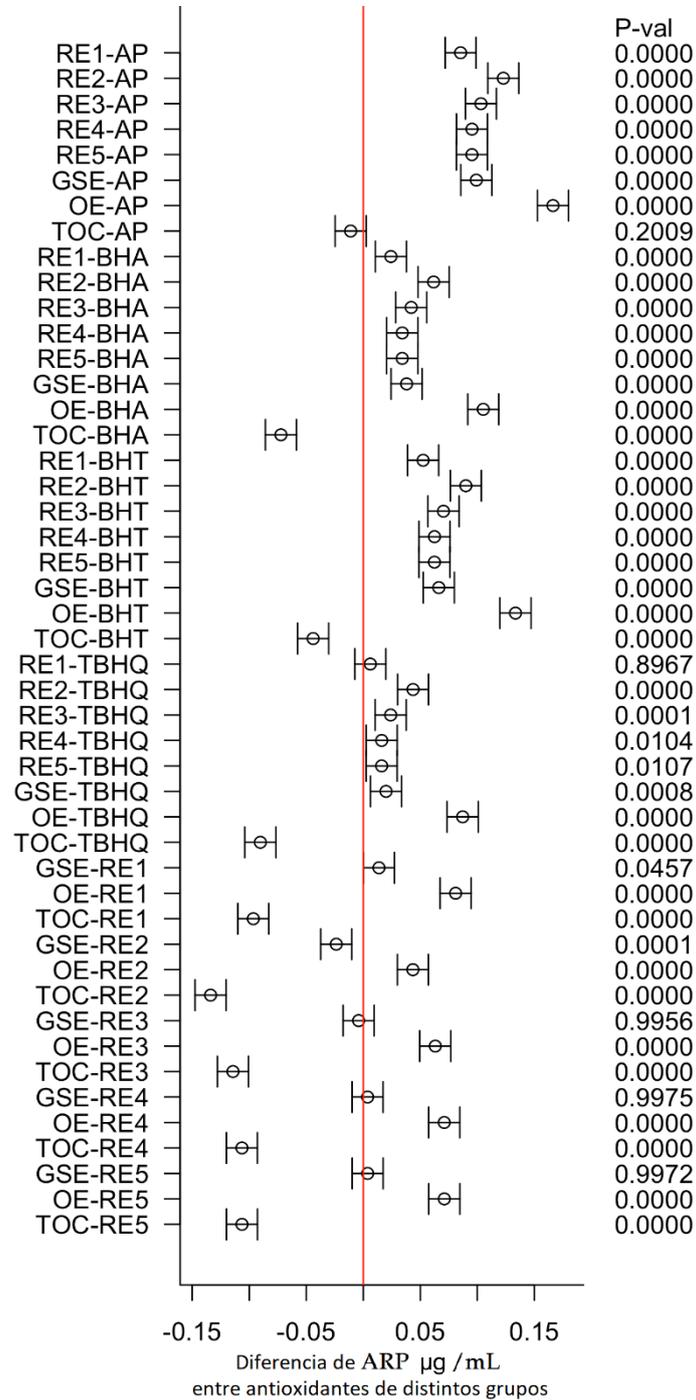


Figura 2.14. Análisis comparativo de ARP ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) entre sustancias de distintos grupos de antioxidantes.

Como comentario final, es importante señalar que una extensa búsqueda bibliográfica sólo arrojó un estudio que menciona aspectos similares a los que describimos (Y. Zhang *et al.*, 2010). El trabajo en cuestión utiliza el método DPPH para determinar la capacidad antirradical y compara los compuestos sintéticos, TBHQ, BHT y BHA, con tres RE que contienen sólo CA en diferentes concentraciones: 98, 60 y 25%. A diferencia de nuestro estudio, Zhang *et al.* compararon iguales cantidades de producto en lugar de PPA, y midieron la actividad antirradical frente a DPPH\* sólo a los 30 min, en vez de esperar hasta la meseta.

El orden de eficacia obtenido por estos autores en las condiciones descritas fue TBHQ > CA 98% > BHA > CA 60% > CA 25% > BHT, coincidiendo en parte con los resultados de nuestro trabajo. En el caso de los antioxidantes sintéticos, el orden de eficacia relativa en ambos estudios fue TBHQ > BHA > BHT. En el caso de los distintos RE, teniendo en cuenta que el único diterpeno presente en ellos es el CA, se observó una relación lineal inequívoca entre la actividad antirradical y la concentración de CA. Sin embargo, la principal discrepancia es que en el estudio de Zhang *et al.* el TBHQ mostró una mayor actividad antioxidante que el CA (98%), mientras que nuestro estudio, que comparó cantidades iguales de PAA para todas las sustancias, RE5 (el RE más rico en CA) mostró una mayor actividad que la misma cantidad de TBHQ. Este hallazgo parece estar directamente relacionado con la ausencia de COL en el RE purificado utilizado en el estudio de Zhang *et al.*, ya que, como describimos en el siguiente apartado (2.3.4 Influencia de la relación CA/COL en la actividad antirradical de RE), aunque el CA presente una mayor capacidad antirradical que COL, la presencia de cantidades significativas de COL en el RE puede aumentar la actividad antioxidante del mismo en un 15-20% en comparación con otro RE con una proporción menor de esta lactona.

#### **2.3.4. Influencia de la relación CA/COL en la actividad antirradical de RE.**

Uno de los objetivos planteados en este trabajo es estudiar el efecto que la ratio CA/COL de un RE puede tener sobre la capacidad antioxidante del mismo. Con este fin, se utilizaron cinco RE en este estudio que, si bien presentan distintas ratios CA/COL, todos fueron aplicados de forma que la misma cantidad de

diterpenos (CA+COL) estuviera siempre presente en el medio. Esto nos permitió conocer la posible influencia específica de las diferentes relaciones CA/COL en la actividad antirradical frente al DPPH<sup>•</sup> de los RE comerciales.

En la Tabla 2.4 se muestran los valores de ARP ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) de los cinco RE estudiados. Para facilitar la interpretación de la relación entre la capacidad antirradical y la distribución CA/COL, se añaden de nuevo en esta tabla tanto las cantidades absolutas de diterpenos como su ratio.

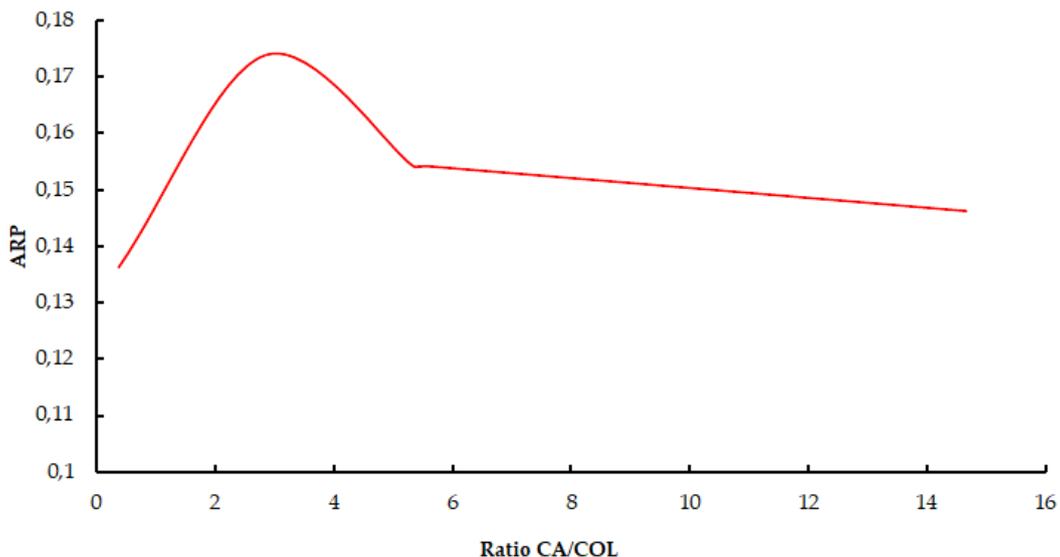
**Tabla 2.4.** Efecto de la ratio ácido carnósico/carnosol sobre la capacidad antirradical de los distintos extractos de romero.

Extracto	CA*	COL*	CA/COL**	ARP ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )**
RE1	5,76 $\pm$ 0,00	15,55 $\pm$ 0,00	0,37 $\pm$ 0,01	0,14 $\pm$ 0,01
RE2	15,35 $\pm$ 0,00	5,40 $\pm$ 0,00	2,84 $\pm$ 0,2	0,17 $\pm$ 0,01
RE3	34,34 $\pm$ 0,00	5,41 $\pm$ 0,00	5,60 $\pm$ 0,01	0,15 $\pm$ 0,00
RE4	3,82 $\pm$ 0,00	0,72 $\pm$ 0,00	5,34 $\pm$ 0,19	0,15 $\pm$ 0,01
RE5	75,65 $\pm$ 0,01	5,16 $\pm$ 0,00	14,66 $\pm$ 0,13	0,15 $\pm$ 0,00

Todos los resultados expresados como media  $\pm$  SD (n=3). \* concentración expresada en términos de % de contenido absoluto para CA y COL. \*\*La ratio CA/COL y ARP ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) son coeficientes por lo que no tienen unidades.

Observamos que, el RE2, sin ser el RE que presenta la mayor cantidad absoluta de CA, es el que muestra una capacidad antioxidante significativamente mayor que el resto: RE3 ( $p < 0,001$ ), RE5 ( $p < 1e-04$ ), RE4 ( $p < 1e-04$ ) y RE1 ( $p < 1e-04$ ). Estos resultados podrían indicar que una relación CA/COL en el rango de 2,5-3,0 podría ser óptima para que un RE actúe como antioxidante. Los valores más bajos de esta relación de diterpenos llevaron a una disminución de la actividad antirradical de extracto, que sólo puede atribuirse inicialmente a la disminución en la proporción del diterpeno más activo, CA. Los valores más altos (alrededor del doble) también conducen a una reducción de la actividad, lo que, obviamente, no puede atribuirse a la disminución del nivel de CA. Por encima de la relación antes

mencionada, y hasta un valor muy alto (casi sin COL), la actividad no cambia (Figura 2.15).

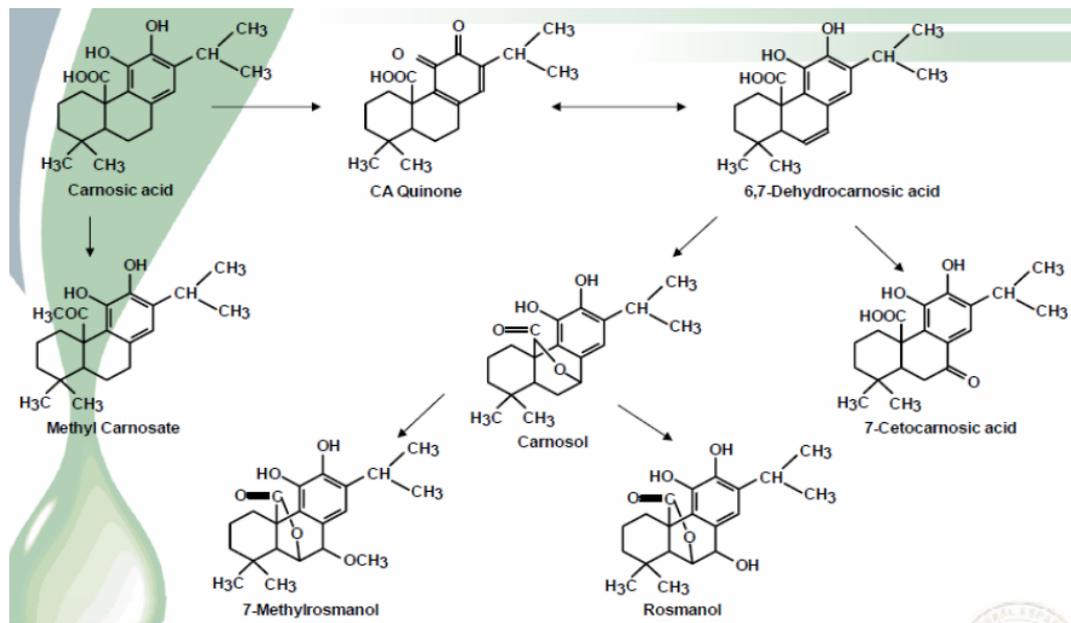


**Figura 2.15.** Representación de la actividad antirradical ARP ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (en eje de abscisas) *versus* la ratio ácido carnósico/carnosol (en el eje de ordenadas).

Aruoma, Halliwell, Aeschbach y Löliger, (Aruoma *et al.*, 1992) establecieron que más del 90% de la actividad antioxidante del romero se debía a la presencia de dos compuestos diterpénicos: CA y COL. Desde entonces, ha habido controversia sobre cuál de ellos posee la mayor actividad antioxidante, aunque es ampliamente aceptado que el CA muestra mayor actividad antirradical que el COL (Del Baño, Benavente-García, Marín, Marín, & Castillo, 2006; del Baño *et al.*, 2003; Ibarra *et al.*, 2010; Jordán *et al.*, 2012, 2014). En estos estudios comparativos se utilizaron tanto diterpenos puros como una variedad de técnicas *in vitro*, lo que ayudaría a explicar la gran heterogeneidad de los resultados obtenidos.

Es importante no olvidar otro aspecto: el metabolismo oxidativo del CA (ver Figura 2.16), el principal diterpeno presente en *Rosmarinus officinalis* (Schwarz & Ternes, 1992). Varios estudios sugieren que el ácido 6,7-dehidrocarnósico es el

primer paso en la vía de oxidación de CA (Del Baño *et al.*, 2006; Munne-Bosch, Schwarz, & Alegre, 1999); sin embargo, este compuesto se transforma casi inmediatamente en otros dos: ácido 7-keto-carnosol y, principalmente, COL. Por esta razón, el COL es el principal compuesto diterpénico que acompaña al CA en el RE.



**Figura 2.16.** Ruta de oxidación del ácido carnósico.

Ibarra *et al.* (2010) estudiaron la importancia de los procedimientos de extracción de la hoja de romero y su influencia en la distribución de diterpenos de los extractos obtenidos. Esta distribución diterpénica es el resultado de un extracto nativo, pero puede modificarse mediante procesos selectivos de separación y purificación (Ibarra *et al.*, 2010) (ver procesos de extracción y separación de diterpenos en capítulo 1).

Hay muy poca investigación sobre la posible influencia de la relación CA/COL en la actividad antioxidante del RE. Sin embargo, en un estudio sobre la degradación del color de la oleorresina de pimentón, se observó un efecto antioxidante sinérgico del COL sobre el CA en una proporción de 1:1 (p/p), mientras que un aumento en el contenido de COL no condujo a ninguna mejora en

la eficacia antioxidante (Rajeev, Johannah, Gopakumar, Maliakel, & Krishnakumar, 2017).

Nuestros resultados confirman que el CA tiene una mayor actividad antioxidante que el COL y sugieren que la presencia de una cierta proporción de COL, en un rango estrecho de valores, genera un efecto antioxidante sinérgico, probablemente porque es el principal metabolito estable de la cadena oxidativa del CA y su presencia mejora la estabilidad oxidativa del mismo.

Es necesario llevar a cabo estudios comparativos de estos antioxidantes sobre matrices alimentarias para establecer si este “rango óptimo” definido en la ratio CA/COL muestra también mejoras significativas en la inhibición del enranciamiento lipídico.

### **2.3.5. Influencia del tiempo de reacción en la estimación de la capacidad antirradical. Cinética de la reacción**

En la mayoría de los ensayos con DPPH\* reportados en la literatura, el valor de EC<sub>50</sub> se mide después de un tiempo de incubación establecido; sin embargo, ha sido ampliamente descrito que usar un tiempo fijo al estimar la actividad antioxidante no tiene en cuenta el comportamiento cinético de los antioxidantes (Dawidowicz *et al.*, 2012; Fadda *et al.*, 2014; Kedare & Singh, 2011; Mishra *et al.*, 2012).

Esta práctica puede llevar a subestimar la actividad antioxidante, sobre todo si consideramos la heterogeneidad de las estructuras moleculares en general y de las incluidas en este estudio. Por este motivo se decidió, en este trabajo, monitorizar el descenso de la absorbancia hasta alcanzar la meseta, tal y como el método lo describe en su origen (Brand-Williams *et al.*, 1995).

En la Tabla 2.5 se muestran los valores de ARP ( $\mu\text{mol}$  de PAA/  $\mu\text{mol}$  de DPPH\*) para cada antioxidante calculados a los 30 min, a los 60 min y cuando se ha alcanzado la meseta de la reacción, así como el tiempo necesario para alcanzar esta meseta.

**Tabla 2.5.** Influencia del tiempo de reacción sobre el ARP ( $\mu\text{mol PAA}/\mu\text{mol DPPH}^*$ )

Antioxidante	ARP* 30 min	ARP* 60 min	ARP* meseta	Tiempo**
BHA	0,2 $\pm$ 0,00	0,39 $\pm$ 0,03	2,81 $\pm$ 0,18	16-24
BHT	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	2,53 $\pm$ 0,01	48
TBHQ	1,98 $\pm$ 0,22	2,66 $\pm$ 0,19	3,50 $\pm$ 0,22	3-4
AP	3,38 $\pm$ 0,16	3,38 $\pm$ 0,00	3,38 $\pm$ 0,17	0-0,25
TOC	2,03 $\pm$ 0,08	2,41 $\pm$ 0,08	2,74 $\pm$ 0,08	2-3
RE-1	5,13 $\pm$ 0,22	5,79 $\pm$ 0,19	6,87 $\pm$ 0,46	16-24
RE-2	4,64 $\pm$ 0,01	5,06 $\pm$ 0,16	8,34 $\pm$ 0,62	16-24
RE-3	4,37 $\pm$ 0,09	4,72 $\pm$ 0,08	7,96 $\pm$ 0,38	16-24
RE-4	4,16 $\pm$ 0,09	4,58 $\pm$ 0,11	7,54 $\pm$ 0,11	16-24
RE-5	4,06 $\pm$ 0,13	4,24 $\pm$ 0,12	7,27 $\pm$ 0,44	16-24
GSE	12,25 $\pm$ 0,64	15,45 $\pm$ 0,87	34,92 $\pm$ 4,55	24-32
OE	0,64 $\pm$ 0,09	1,17 $\pm$ 0,10	4,69 $\pm$ 0,29	10-32
TLX	3,33 $\pm$ 0,07	3,76 $\pm$ 0,09	3,90 $\pm$ 0,09	1-2

\*Resultados ARP ( $\mu\text{mol PAA}/\mu\text{mol DPPH}^*$ ) expresados como media  $\pm$  SD (n=3).

\*\*Intervalo de tiempo necesario para alcanzar la meseta expresado en horas.

Como se observa en los resultados descritos en la Tabla 2.5, es evidente que todos los antioxidantes estudiados varían, en algunos casos de forma significativa, en su actividad (valores de ARP  $\mu\text{mol PAA}/\mu\text{mol DPPH}^*$ ) a medida que pasa el tiempo, hasta alcanzar la llamada meseta. El AP alcanza la meseta en los primeros min de reacción, resultado que coincide con los de otros autores que muestran que el ácido ascórbico reacciona rápidamente con el DPPH<sup>\*</sup>. (Brand-Williams *et al.*, 1995; Fadda *et al.*, 2014; Mishra *et al.*, 2012; Sharma & Bhat, 2009; J. Xie & Schaich, 2014).

Al comparar los valores de ARP ( $\mu\text{mol PAA}/\mu\text{mol DPPH}^*$ ) obtenidos para los distintos antioxidantes a los 30 min con los obtenidos en la meseta de la reacción (sin tener en cuenta el tiempo necesario para alcanzar dicha meseta), podemos

dividir los compuestos analizados en diferentes grupos. El primer grupo incluiría TLX, TOC y RE1, que a los 30 min alcanzaron 85, 74 y 75%, respectivamente, de su actividad potencial total. El segundo grupo, que podría decirse que contiene compuestos de actividad intermedia, a los 30 min sólo alcanzó alrededor del 50% de su actividad potencial total, como fue el caso de TBHQ (57%) y el resto de los RE (RE2, RE3, RE4 y RE5) (rango 55-56%). La actividad de los otros dos extractos naturales, GSE y OE, fue más lenta, alcanzando el 35 y el 14% de su actividad total respectivamente a los 30 min. Finalmente, el comportamiento de dos de los antioxidantes sintéticos más utilizados en la industria alimentaria, BHA y BHT, puede parecer sorprendente, ya que mostraron menos del 10% de su actividad potencial a los 30 min de reacción. Sin embargo, nuestros resultados coinciden con los que anteriormente han descrito la lenta actividad del BHA (Brand-Williams *et al.*, 1995; Fukumoto & Mazza, 2000) y BHT (Brand-Williams *et al.*, 1995; Fukumoto & Mazza, 2000; Romano, Abadi, Repetto, Vojnov, & Moreno, 2009; Sharma & Bhat, 2009).

Del mismo modo, si se comparan los resultados de ARP ( $\mu\text{mol PAA}/\mu\text{mol DPPH}^*$ ) obtenidos a los 60 min con los obtenidos a los 30 min y en la meseta de la reacción, las conclusiones son similares a las descritas anteriormente.

A pesar de las distintas cinéticas que muestran los compuestos ensayados, es importante considerar también la eficacia en la capacidad antirradical de estos compuestos en función de si consideramos el ARP ( $\mu\text{mol PAA}/\mu\text{mol DPPH}^*$ ) a los 30 min o en la meseta de la reacción. En ambos casos, el orden sería el siguiente:

ARP ( $\mu\text{mol PAA}/\mu\text{mol DPPH}^*$ ) a los 30 min:

GSE> RE1> RE2> RE3> RE4> RE5> AP> TLX> TOC> TBHQ> OE> BHA> BHT

ARP ( $\mu\text{mol PAA}/\mu\text{mol DPPH}^*$ ) en la meseta:

GSE> RE2> RE3> RE4> RE5> RE1> OE> TLX> TBHQ> AP> BHA> TOC> BHT

GSE sigue siendo el compuesto con mayor actividad antioxidante *in vitro* frente a la DPPH\*, y todos los RE siguen mostrando una mayor eficacia que el resto de los compuestos probados. Sólo OE y AP muestran un cambio significativo en su posición en el orden de eficacia, ambos relacionados con su cinética de acción lenta

y muy rápida, respectivamente. Los cambios mínimos en el orden de eficacia del resto de los compuestos no son significativos.

En cuanto al tiempo de reacción utilizado para estimar la actividad de barrido del DPPH<sup>•</sup> (cinética de reacción) y, para analizar nuestros resultados, es importante que se tengan en cuenta dos consideraciones en cualquier comparación con los resultados obtenidos por otros autores. En primer lugar, el hecho de que los rangos de concentración utilizados para cada PAA analizado se seleccionaron y ajustaron de forma que los valores finales de absorbancia, una vez alcanzada la meseta, permanecieran dentro del rango de fiabilidad del espectrofotómetro. Se ha descrito cómo una menor concentración de antioxidantes se relaciona con una menor capacidad antirradical frente a DPPH<sup>•</sup> (Dawidowicz *et al.*, 2012; Fadda *et al.*, 2014; Mishra *et al.*, 2012), por lo que es posible que nuestros resultados identifiquen una tasa de reacción más lenta para algunos de los productos que han sido estudiados previamente, ya que utilizamos concentraciones más bajas que las utilizadas por otros autores.

Asimismo, se debe considerar la posible influencia del disolvente utilizado en nuestro ensayo, ya que puede ralentizar la velocidad de reacción mediante algún mecanismo (ya conocido entre el DMSO y el ácido ascórbico) mediado por el efecto estabilizador del DMSO como base Lewis sobre la reactividad de las moléculas antioxidantes con el DPPH<sup>•</sup> (Markaryan, Tavadyan, Kocharyan, & Shahinyan, 2013).

Además de esto, Dawidowicz *et al.*, que estudiaron la influencia del tipo de disolvente en la capacidad del BHT para reducir el DPPH<sup>•</sup> utilizando tres solventes diferentes (acetato de etilo, cloroformo y dioxano), observaron que, aunque la actividad antirradical del BHT medida después de 60 min de incubación dependía del tipo de disolvente utilizado en la reacción, esto no sucedía cuando la actividad antirradical era determinada en la meseta de la reacción. Los autores concluyeron que la cantidad de DPPH<sup>•</sup> que quedaba sin reaccionar al final de la reacción era independiente del tipo de disolvente (Dawidowicz *et al.*, 2012). En cualquier caso, nuestro objetivo era comparar los diferentes antioxidantes incluidos en este estudio, y no obtener valores absolutos de actividad.

Considerando la importancia de la relación CA/COL sobre la capacidad antioxidante del romero descrita anteriormente, merece una consideración especial desde un punto de vista cinético. El diferente comportamiento cinético de RE1 con respecto a los otros extractos de RE puede estar relacionado con el hecho de que RE1 es el único RE en el que el diterpeno mayoritario en cuanto a concentración es COL en lugar de CA (relación CA/COL: 0,37), lo que sugiere que COL exhibe una cinética más rápida de reacción con DPPH<sup>\*</sup> que CA. Esta diferencia en la cinética de reacción se confirma también al comparar la capacidad antioxidante del RE1 (que presenta la menor relación de CA/COL: 0,37) y RE5 (que presenta la mayor relación de CA/COL: 14,66). En el caso del RE1, los valores de ARP ( $\mu\text{mol PAA}/\mu\text{mol DPPH}^*$ ) a los 30 y a los 60 min alcanzaron el 75 y el 84% de la actividad total del extracto (ARP en la meseta), en cambio, en el caso del RE5, se alcanzó el 56 y el 58% de la actividad total del extracto en esos mismos tiempos. El extracto RE5 presenta la cinética más lenta de todos los RE estudiados en este ensayo. En resumen, podría decirse que el CA es más efectivo que el COL, pero que el COL interactúa más rápidamente con el radical DPPH. Desde el punto de vista estructural, esto se relacionaría exclusivamente con la desaparición del grupo del ácido carboxílico de la CA, y su conversión en lactona intramolecular en COL.

#### 2.4. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este capítulo concluyen que:

1. El RE, actualmente utilizado como antioxidante alimentario (E-392), muestra mayor capacidad antirradical frente a DPPH<sup>•</sup> que los compuestos sintéticos BHT (E-321), BHA (E-320), TBHQ (E-319) y AP (E-304) utilizados para el mismo propósito. Además, el RE también se posiciona delante del extracto rico en tocoferoles (E-306), su principal competidor dentro de los antioxidantes de origen natural en la industria alimentaria.
2. El estudio realizado sobre la posible influencia de la relación CA/COL sobre la actividad antioxidante del RE, confirma que el CA presenta mayor actividad antioxidante que el COL, pero sugieren que la presencia de una cierta proporción de esta lactona, en un rango estrecho de valores (2,5-3,0), tiene un efecto sinérgico sobre el CA, potenciando la actividad antirradical del RE.
3. En cuanto a la cinética de reacción, es decir, la influencia del tiempo de reacción empleado para la determinación de la capacidad antirradical, todos los antioxidantes estudiados mostraron variaciones en los valores de ARP ( $\mu\text{mol PAA}/\mu\text{mol DPPH}^{\bullet}$ ) en función del tiempo de reacción estimado (30 min, 60 min o meseta de reacción). En algunos casos estas variaciones cambiaron significativamente las conclusiones en cuanto al orden de eficacia de los antioxidantes estudiados. A partir de estos resultados podemos confirmar que la práctica de medir la capacidad antirradical frente a DPPH<sup>•</sup> antes de que la reacción alcance la meseta ofrece resultados que, al no tener en cuenta la velocidad de reacción de las distintas naturalezas moleculares de los antioxidantes, no ofrecen una información realista a la hora de comparar su capacidad antirradical. Al estudiar la cinética de reacción de los distintos RE observamos que, aunque el CA es más efectivo que el COL, este último parece reaccionar más rápido con DPPH<sup>•</sup> que el CA.

4. Los resultados obtenidos para OE y, especialmente, GSE, apuntan a su gran potencial para su uso como antioxidantes tecnológicos en alimentos. Sin embargo, su uso efectivo en el futuro requiere múltiples estudios de aplicabilidad en matrices de alimentos, principalmente debido a sus propiedades físico-químicas, solubilidad, color, efectos organolépticos, etc. (datos no mostrados).



## Capítulo 3: Caracterización Lipídica de Aceites Alimentarios



## CAPÍTULO 3. CARACTERIZACIÓN LIPÍDICA DE ACEITES ALIMENTARIOS

### 3.1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Los lípidos de los alimentos son los componentes más susceptibles a la oxidación. Estas reacciones de oxidación lipídica son una de las principales fuentes de deterioro que se producen durante la fabricación, almacenamiento, distribución y preparación final de los alimentos. Los cambios oxidativos pueden causar la aparición de sabores desagradables o ranciedad, la pérdida de color, la alteración del valor nutritivo, y pueden producir compuestos tóxicos que pueden ser perjudiciales para la salud de los consumidores. Incluso aunque los niveles de estos compuestos sean bajos, en un alimento, el problema de la oxidación de los lípidos compromete gravemente la calidad de algunos productos alimenticios y limita la vida útil de otros (Ahmed *et al.*, 2016).

La elección de las matrices alimentarias estudiadas en esta memoria se basó en su composición mayoritariamente lipídica, ya que se trata de analizar el efecto de los antioxidantes contemplados sobre la estabilidad de los lípidos dentro del alimento. Se conoce que la composición de FA es particularmente importante en relación con la estabilidad oxidativa de las grasas y aceites ya que, cuanto más insaturada sea una grasa, más rápida será la reacción de oxidación (de Camargo *et al.*, 2016; Liu & White, 1992). Por estos motivos, las matrices lipídicas sometidas a estudio fueron tres aceites comerciales de uso alimentario ricos en MUFA y PUFA de distinta naturaleza. Los tres aceites seleccionados fueron: aceite de girasol alto oleico refinado (rico en n-9), aceite de semilla de uva refinado (rico en n-6) y aceite de pescado enriquecido en DHA (rico en n-3).

El objetivo único de este capítulo fue realizar el análisis de perfil lipídico de cada uno de los aceites alimentarios incluidos en este trabajo, con el fin de, analizar el efecto de las sustancias antioxidantes estudiadas sobre la inhibición del enranciamiento en cada naturaleza lipídica.

## 3.2. MATERIAL Y MÉTODO

### 3.2.1. Material

#### 3.2.1.1. Reactivos

- n-Hexano (133242.1611-PanReac).
- Metanol (361091.1612-PanReac).
- Agua HPLC (361074.1612-PanReac)
- Sulfato de sodio anhidro (8.22286 Sigma-Aldrich)
- Hidróxido de sodio (06203 Sigma-Aldrich)
- Tricloruro de boro (12%) en metanol (91379 Supelco-Sigma-Aldrich)
- GLC mix de FAMES de referencia (GLC-566B Nu-Chek)
- Tricosanoato de metilo (T9900 Sigma-Aldrich)
- Éster metílico del ácido cis-10-pentadecanoico (U-38-M Nu-Chek)

#### 3.2.1.2. Matrices lipídicas

- Aceite de girasol de alto oleico refinado. Borges International Group (Lleida, España).
- Aceite de semilla de uva refinado. Borges International Group (Lleida, España).
- Aceite de pescado (DHA-Algatrium 70%). Brudy Technology SL (Barcelona, España).

### 3.2.2. Método

#### 3.2.2.1. Fundamento

El perfil lipídico de las muestras de aceite se determinó según el método oficial AOCS Ce 1i-07 (AOCS, 2009b). Este método proporciona un procedimiento de cromatografía de gas-líquido (GLC) para la determinación de la composición de FA de aceites marinos y otros aceites que contienen PUFA de cadena larga. La GLC requiere que las muestras a

analizar sean compuestos volátiles o fácilmente volatilizables. Por este motivo se hace necesaria para el análisis la derivatización de los FA de la muestra a analizar a sus correspondientes ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMEs).

Los distintos FAMEs presentes en la muestra se separan de acuerdo con la longitud de su cadena, el grado de insaturación y la posición del doble enlace (es decir, isómeros posicionales).

### *3.2.2.2. Procedimiento*

Para conocer con precisión el peso exacto de la muestra se pesó primeramente el tubo de ensayo (con tapón de rosca) vacío y seco. Se dosificaron aproximadamente 350  $\mu$ L de aceite en el tubo de ensayo y se calentó la muestra a 60°C bajo N<sub>2</sub> hasta peso constante. El peso de la muestra se obtuvo restando el peso del tubo vacío al peso del tubo con la muestra después de haber calentado.

Al tubo con la muestra se añadió 1 mL de disolución de patrón interno, que consiste en una disolución de 100 mg de tricosanoato de metilo y 50 mg de éster metílico del ácido cis-10-pentadecanoico en 50 mL de hexano.

La derivatización de los FA a sus correspondientes FAMEs se llevó a cabo siguiendo el siguiente proceso:

1. Al tubo de ensayo con la muestra y el patrón interno se añadió 1 mL de una solución de hidróxido de sodio en metanol al 2% (p/v). Se cerró herméticamente, se agitó y se calentó en un baño de agua hirviendo durante 7 min.
2. Una vez enfriado se añadió 1 mL de solución de tricloruro de boro en metanol al 12 % (p/p). Se cerró herméticamente, se agitó y se calentó en un baño de agua hirviendo durante 20 min.
3. Tras enfriarse la mezcla a temperatura ambiente, se añadieron 2 mL de hexano y 1 mL de agua y se agitó 30 segundos.
4. Una vez se produjo la separación de fases, se transfirió la fase orgánica (superior) a un nuevo tubo de ensayo.
5. Al tubo con la solución orgánica se añadieron 0,25 g de Sulfato de sodio y se agitó.

6. Esta mezcla se filtró a través de una membrana de polipropileno de 0,22  $\mu\text{m}$  en un tubo de ensayo vacío.
7. Finalmente se transfirieron 500  $\mu\text{L}$  de la fase orgánica filtrada a un vial de GLC, se añadieron 500  $\mu\text{L}$  de hexano y se agitó. La muestra está lista para ser analizada. Cada muestra se analizó por duplicado.

Los distintos FAMES se separaron en un cromatógrafo de gases (7890B GC Dystem, Agilent Technologies) equipado con una columna capilar DB-WAX-30m x 0,21mm x 0,1  $\mu\text{m}$  (Agilent PN:127-7012). Se utilizó helio como fase móvil a una velocidad de flujo de 0,3 mL/min (flujo constante).

Se inyectó 1  $\mu\text{L}$  de muestra con un split 200:1 (240°C temperatura inyector). La temperatura del horno (flujo de aire 400 mL/min) siguió la siguiente rampa de temperatura programada: 1) la temperatura ascendió desde 40 hasta 190°C a una velocidad de 25°C/min; 2) se alcanzaron los 205°C a una velocidad de 3°C/min; 3) se llegó a la temperatura final de 230°C a una velocidad de 8°C/min, manteniéndose esta temperatura durante 5 min.

Los distintos FA fueron identificados por comparación de sus tiempos de retención con los estándares de referencia y cuantificados mediante un detector de ionización de llama (FID) con un flujo de hidrógeno de 40 mL/min (240°C temperatura detector). El análisis de cada muestra se realizó por duplicado. Los resultados se expresaron como porcentajes de peso (g de ácido graso/100 g aceite) tras haber sido integrados y calculados.

### 3.2.2.3. Expresión de resultados

Para el cálculo del contenido en masa de cada uno de los FA identificados en la muestra se empleó la siguiente fórmula:

$$\text{FAME (g/100g)} = \frac{A_{\text{FAME}} \times M_{\text{TM}}}{A_{\text{TM}} \times M_{\text{M}}} \times \text{RF} \times 100$$

Siendo:

$A_{\text{FAME}}$ : área del éster de metílico del FA obtenida del CG de la muestra.

$M_{\text{TM}}$ : peso del patrón interno (tricosanoato de metilo) añadido a la muestra, 2 mg (1 mL de 100 mg de tricosanoato de metilo en 50 mL añadido a la muestra).

$A_{\text{TM}}$ : área del patrón interno (tricosanoato de metilo) obtenida del cromatograma de la muestra.

$M_{\text{M}}$ : peso de la muestra, en mg.

RF: factor de respuesta para FID

EL factor de respuesta (RF) del FID para cada FA en relación con el patrón interno, tricosanoato de metilo, se determinó empíricamente a partir de la inyección de la solución del GLC mix de FAMES de referencia usando la siguiente fórmula:

$$RF_{\text{FAME}} = \frac{A_{\text{TM}} \times M_{\text{FAME}} \times P_{\text{FAME}}}{A_{\text{FAME}} \times M_{\text{TM}} \times P_{\text{TM}}}$$

Siendo:

$A_{\text{TM}}$ : área del tricosanoato de metilo obtenida del cromatograma del mix de FAMES de referencia.

$M_{\text{FAME}}$ : fracción de masa en porcentaje del correspondiente FAME en el mix de FAMES de referencia, dato obtenido del certificado de análisis del proveedor.

$P_{\text{FAME}}$ : pureza en porcentaje del correspondiente FAME en el mix de FAMES de referencia, dato obtenido del certificado de análisis del proveedor.

$A_{\text{FAME}}$ : área del FAME obtenida del cromatograma del mix de FAMES de referencia.

$M_{\text{TM}}$ : fracción de masa en porcentaje del tricosanoato de metilo en el mix de FAMES de referencia, dato obtenido del certificado de análisis del proveedor.

$P_{\text{TM}}$ : pureza en porcentaje del tricosanoato de metilo en el mix de FAMES de referencia, dato obtenido del certificado de análisis del proveedor.

### 3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.3.1. Aceite de girasol alto oleico refinado

El aceite refinado de girasol posee aproximadamente un 70% de ácido linoleico, y un 14% de ácido oleico. Es esta composición de FA de naturaleza mayoritariamente poliinsaturada la que lo hace altamente susceptible a la oxidación (Ali *et al.*, 2013; Normand, Eskin, & Przybylski, 2006). El calentamiento de grasas y aceites acelera las reacciones de oxidación, que es una de las principales problemáticas en los procesos de fritura. Actualmente se dispone de tecnología para alterar la composición de FA de las semillas oleaginosas mediante la modificación genética o la reproducción tradicional. Diversos aceites de semillas, entre ellos el aceite de girasol, han sido modificados para mejorar su estabilidad oxidativa aumentando los niveles de ácido oleico a 70-90% (Fuller, Guadagni, Weaver, Notter, & Horvat, 1971). El aceite de girasol “alto oleico” es el resultado de la modificación genética de una variedad de semillas de girasol. (*Helianthus annuus*, L.). Se ha descrito que, la disminución en el contenido de ácido linoleico en este aceite, en pro del aumento de la concentración de ácido oleico, da como resultado un aumento de la estabilidad oxidativa tanto del aceite de fritura como de los alimentos sometidos a este proceso tecnológico, (Ali *et al.*, 2013; Warner, Orr, & Glynn, 1997). Además, debido a su composición rica en FA n-9, se ha observado que este aceite puede disminuir el riesgo de enfermedad cardiaca coronaria al disminuir la susceptibilidad del LDL colesterol a la oxidación (Ashton, Best, & Ball, 2001).

La Tabla 3.1 muestra el contenido absoluto de los FA detectados en el aceite de girasol alto oleico refinado analizado en este estudio (GIR). Observamos que la proporción de SFA, MUFA y PUFA es de 8%, 78% y 7% respectivamente. El ácido oleico se encuentra en una proporción del 78% en este aceite. Los resultados obtenidos son similares a los reportados por otros autores (Ali *et al.*, 2013; Merrill, Pike, Ogden, & Dunn, 2008; Warner *et al.*, 1997). La Figura 3.1 se muestra el cromatograma de GLC obtenido para GIR.

**Tabla 3.1.** Perfil lipídico del aceite de girasol alto oleico.

<b>Ácido graso</b>	<b>Estructura</b>	<b>g/100g</b>
Ácido tridecanoico	C13	0,04±0,00
Ácido mirístico	C14	0,04±0,00
Ácido palmítico	C16	4,11±0,01
Ácido palmitoleico	C16:1	0,11±0,00
Ácido margárico	C17	0,03±0,00
Ácido estárico	C18	3,15±0,01
Ácido oléico	C18:1n9	83,03±0,06
Ácido linoleico	C18:2n6	7,88±0,00
Ácido alfa-linolénico	C18:3n3	0,05±0,00
Ácido araquídico	C20	0,27±0,00
Ácido eicosenoico	C20:1n9	0,20±0,01
Ácido docosanoico	C22	0,84±0,05
Ácido lignocérico	C24	0,24±0,02
<b>Total ácidos grasos saturados</b>		8,72±0,05
<b>Total ácidos grasos monoinsaturados</b>		83,35±0,05
<b>Total ácidos grasos poliinsaturados</b>		7,93±0,00

Resultados expresados como media  $\pm$ SD (n=2) en porcentaje de peso (g FA/100g aceite).

### 3.3.2. Aceite de semilla de uva refinado

El orujo de uva, que se compone de semillas de uva, piel y restos de tallo, es uno de los principales subproductos generados por la industria vitivinícola, y es principalmente utilizado para la producción de alcohol. Un uso alternativo de este subproducto consiste en la recuperación del aceite de la semilla de la uva, proceso que normalmente se lleva a cabo a través de extracción mecánica y/o extracción con disolventes orgánicos (Makris, Boskou, & Andrikopoulos, 2007).

Se ha descrito que el aceite de semilla de uva de alta calidad se caracteriza por poseer sabor ligero con toques frutales, alto punto de humo (216 °C), alta digestibilidad y un ligero aumento de la viscosidad cuando se utiliza para realizar procesos de fritura por inmersión (Garavaglia, Markoski, Oliveira, & Marcadenti, 2016; Kinsella, 1974)

Desde el punto de vista nutricional y terapéutico, el aceite de semilla de uva tiene un alto contenido en ácido linoleico (importante para la síntesis de prostaglandinas, que influye en la agregación plaquetaria y en los procesos inflamatorios), alto contenido en vitamina E (ayuda a reducir el riesgo de padecer arteriosclerosis) y bajos valores de colesterol, por lo que se reconoce que su ingesta puede ser beneficiosa para prevenir problemas cardíacos y circulatorios (Krawczyńska, Olczak, Rembiszewska, & Gromadzka-Ostrowska, 2013; F. B. Shinagawa, Santana, Torres, & Mancini-Filho, 2015).

Aunque la semilla de uva también es rica en compuestos fenólicos, principalmente proantocianidinas, antioxidantes naturales con fuerte actividad antirradical, las cantidades de estos compuestos que se recuperan con el aceite son muy limitadas debido a la naturaleza polar de su estructura química (Joshi, Kuszynski, & Bagchi, 2001; Nakamura, Tsuji, & Tonogai, 2003).

En cuanto a su composición lipídica, el aceite de semilla de uva tiene un alto contenido en PUFA, en el rango de 85%-90%, siendo el ácido linoleico el más abundante, entre el 66% y el 75 % del total de FA (Lutterodt, Slavin, Whent, Turner, & Yu, 2011; F. B. Shinagawa *et al.*, 2015; F. Shinagawa, Carvalho de Santana, & Filho, 2014). El ácido oleico, de naturaleza monoinsaturada, también se encuentra en gran medida en el aceite de semilla de uva, y los SFA están presentes en menores cantidades. Es importante destacar también que, el aceite de semilla de uva ha mostrado en distintos estudios diferencias en el perfil lipídico en función de la variedad de uva empleada para su obtención (Lachman *et al.*, 2015; Navas, 2009; F. B. Shinagawa *et al.*, 2015).

La Tabla 3.2 muestra el contenido absoluto de los FA detectados en el aceite de semilla de uva refinado analizado en este estudio (SEM). La Figura 3.2 se muestra el cromatograma de GLC obtenido para SEM.

**Tabla 3.2.** Perfil lipídico del aceite de semilla de uva refinado

Ácido graso	Estructura	g/100g
Ácido tridecanoico	C13	0,06 ±0,00
Ácido mirístico	C14	0,04 ±0,00
Ácido palmítico	C16	7,06 ±0,00
Ácido palmitoleico	C16:1	0,09 ±0,00
Ácido margárico	C17	0,06 ±0,00
Ácido estárico	C18	3,93 ±0,01
Ácido oléico	C18:1n9	18,35 ±0,03
Ácido vaccénico	C18:1n11	1,00 ±0,03
Ácido linoleico	C18:2n6	68,69 ±0,03
Ácido alfa-linolénico	C18:3n3	0,29 ±0,00
Ácido araquídico	C20	0,15 ±0,00
Ácido eicosenoico	C20:1n9	0,14 ±0,00
<b>Total ácidos grasos saturados</b>		11,30 ±0,01
<b>Total ácidos grasos monoinsaturados</b>		19,58 ±0,07
<b>Total ácidos grasos poliinsaturados</b>		68,97 ±0,03

Resultados expresados como media ±SD (n=2) en porcentaje de peso (g FA/100g aceite).

Observamos que la proporción de SFA, MUFA y PUFA es de 10%, 2% y 64% respectivamente. El ácido linoleico se encuentra en una proporción del 68% en este aceite. Los resultados obtenidos son en general similares a los reportados por otros autores (Garavaglia *et al.*, 2016; Lachman *et al.*, 2015; Navas, 2009; Pardo, Fernández, Rubio, Alvarruiz, & Alonso, 2009).

### 3.3.3. Aceite de pescado rico DHA

Se estima que, la producción acuícola mundial de peces de aleta es de 54,1 millones de toneladas, con una tasa de crecimiento anual moderada del 5,8% (FAO, 2018). El crecimiento de la acuicultura también se refleja en la generación de subproductos derivados. Aproximadamente el 45% de los tejidos del pescado no son aprovechados en su procesado para el consumo humano, incluyendo despojos, aletas, piel, órganos internos, cabeza, espinas, etc. Estos subproductos de la transformación del pescado contienen valiosas fracciones de proteínas y lípidos, así como vitaminas y minerales (Byun, Taekil, Jung, & Kim, 2008). La fracción lipídica de estos desechos sólidos constituyen un valiosa fuente para la extracción de aceite de pescado rico en PUFA, especialmente FA n-3 (K.-M. Yang & Chiang, 2017).

Durante las últimas tres décadas, los PUFA n-3 han sido un gran foco de interés entre los científicos por sus beneficios para la salud y propiedades nutricionales. En el año 2002, la Asociación Americana del Corazón publicó una declaración científica con el título: "Consumo de pescado, aceite de pescado, ácidos grasos omega-3 y enfermedades cardiovasculares" (Kris-Etherton Penny M., Harris William S., & Appel Lawrence J., 2002). Aunque en los últimos años se han reportado nuevos e importantes hallazgos, incluyendo evidencia de ensayos controlados aleatorios, sobre los efectos beneficiosos de los ácidos grasos n-3 sobre la enfermedad cardiovascular (ECV) en pacientes con ECV preexistentes, así como en individuos sanos (Krauss *et al.*, 2000; Marchioli, Schweiger, Tavazzi, & Valagussa, 2001), el debate sobre la verdadera reducción de riesgo de ECV por la administración de suplementos de PUFA n-3 sigue abierto. Los resultados de los estudios parecen más prometedores para la prevención de la muerte cardiaca, que incluye la muerte por accidentes cardiacos isquémicos, arritmia e insuficiencia cardiaca (Maki & Dicklin, 2018).

El primer exponente de los FA omega-3 es el ácido  $\alpha$ -linolénico (C18:3n3), ácido graso esencial, a partir del cual, vía desaturasas y elongasas, se forman el ácido eicosapentaenoico (C20:5n3, EPA) y posteriormente en el ácido docosahexaenoico (C22:6n3,DHA) (Valenzuela B, Tapia O, González E, & Valenzuela B, 2011). En los últimos años han proliferado numerosas investigaciones tratando de asociar otros beneficios para la salud al consumo de

estos dos PUFA de cadena larga. Muchos de estos estudios se han centrado más específicamente en la suplementación con DHA. Así pues, se ha reportado una disminución de presión intraocular en pacientes y una mejora en los síntomas de sequedad ocular en pacientes con glaucoma que han tomado suplementos ricos en DHA (Romeo Villadóniga, Rodríguez García, Sagastagoia Epelde, Álvarez Díaz, & Domingo Pedrol, 2018; Tellez-Vazquez, 2016). También se ha descrito la capacidad neuroprotectora de este ácido graso en la enfermedad de Parkinson (Gómez-Soler *et al.*, 2018) y mejoras en la función cognitiva (Cardoso, Afonso, & Bandarra, 2016).

La calidad y la composición química de los subproductos marinos varían entre especies, estaciones y zonas de captura, así como en el manejo y procesamiento posterior a la captura, dando lugar a aceites de pescado con perfiles lipídicos igualmente variables (Šimat *et al.*, 2019). Debido a la alta inestabilidad de los PUFA presentes en los aceites de pescado y a la variabilidad en cuanto a su concentración, el objeto principal de los investigadores en los últimos años ha sido desarrollar técnicas de extracción y purificación que, además de ser respetuosas con el medio ambiente, muestren un mayor rendimiento y una mínima degradación de los FA (Maqsood, Benjakul, & Kamal-Eldin, 2012).

El aceite de pescado con el que trabajamos en la presente memoria, Algatrium® Oil es un producto enriquecido en DHA mediante un proceso de reesterificación enzimática. Tras eliminar del aceite de pescado los FA n-6, el colesterol, el ácido fitánico y otros FA n-3, el DHA es concentrado para formar el triglicérido puro de este FA. El proceso de reesterificación enzimática no altera la estructura *cis* de los dobles enlaces de la molécula de DHA, que son los que le confieren su bioactividad y por tanto sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias («Brudy Technology», s. f.).

La Tabla 3.3 muestra el contenido absoluto de los FA detectados en el aceite de pescado enriquecido en DHA analizado en este estudio (PES). Observamos que la proporción de SFA, MUFA y PUFA es de 10%, 2% y 64% respectivamente. El ácido linoleico se encuentra en una proporción del 68% en este aceite. La Figura 3.3 se muestra el cromatograma de GLC obtenido para PES.

Tabla 3.3. Perfil lipídico del aceite de pescado

Ácido graso	Estructura	g/100g
Ácido tridecanoico	C13	0,08±0,00
Ácido mirístico	C14	0,03±0,00
Ácido palmítico	C16	0,06±0,00
Ácido palmitoleico	C16:1	0,13±0,00
Ácido hexadecaeónico	C16:4n1	0,11±0,01
Ácido oléico	C18:1n9	0,07±0,00
Ácido estearidónico	C18:4n3	0,13±0,02
Ácido araquídico	C20	0,25±0,01
Ácido eicosenoico	C20:1n9	0,28±0,00
Ácido araquidónico	C20:4n6	0,09±0,01
Ácido eicosatetraenoico	C20:4n3	0,47±0,00
Ácido eicosapentaenoico	C20:5n3	7,27±0,01
Ácido behénico	C22	0,19±0,00
Ácido cetoleico	C22:1n11	0,15±0,01
Ácido erúcido	C22:1n9	0,07±0,00
Ácido heneicosapentaenoico	C21:5n3	4,79±0,01
Ácido docosatetraenoico	C22:4n6	0,11±0,00
Ácido docosapentaenoico	C22:5n6	0,91±0,00
Ácido docosapentaenoico	C22:5n3	9,86±0,03
Ácido docosahexaenoico	C22:6n3	74,58±0,04
Ácido nervónico	C24:1n9	0,32±0,06
<b>Total ácidos grasos saturados</b>		0,61±0,01
<b>Total ácidos grasos monoinsaturados</b>		1,03±0,05
<b>Total ácidos grasos poliinsaturados</b>		98,32±0,04

Resultados expresados como media ±SD (n=2) en porcentaje de peso (g FA/100g aceite).

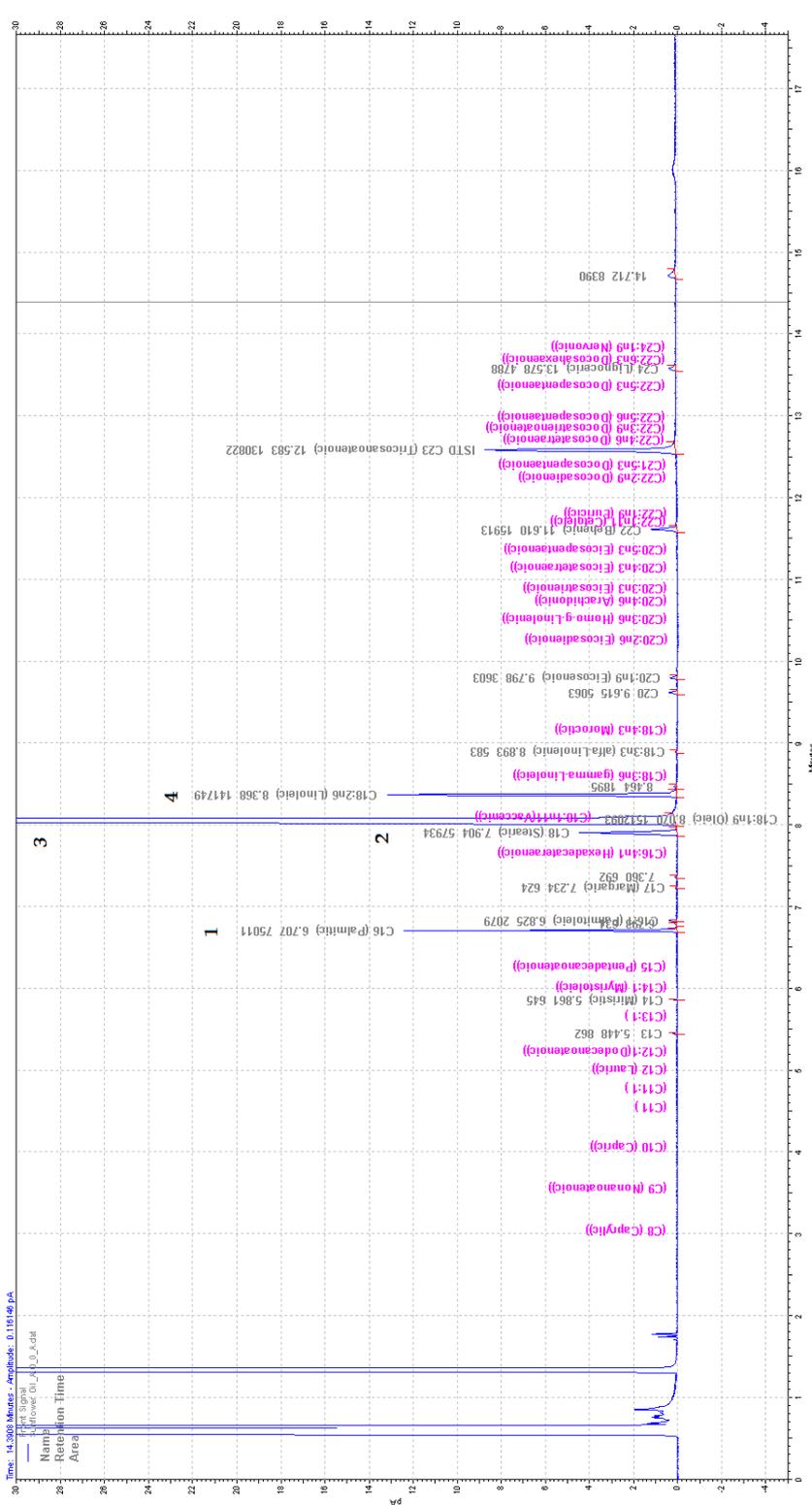


Figura 3.1. Cromatograma GLC del aceite de girasol alto oleico refinado. Principales picos: 1, ácido palmítico; 2, ácido esteárico; 3, ácido oleico; 4, ácido linoleico.

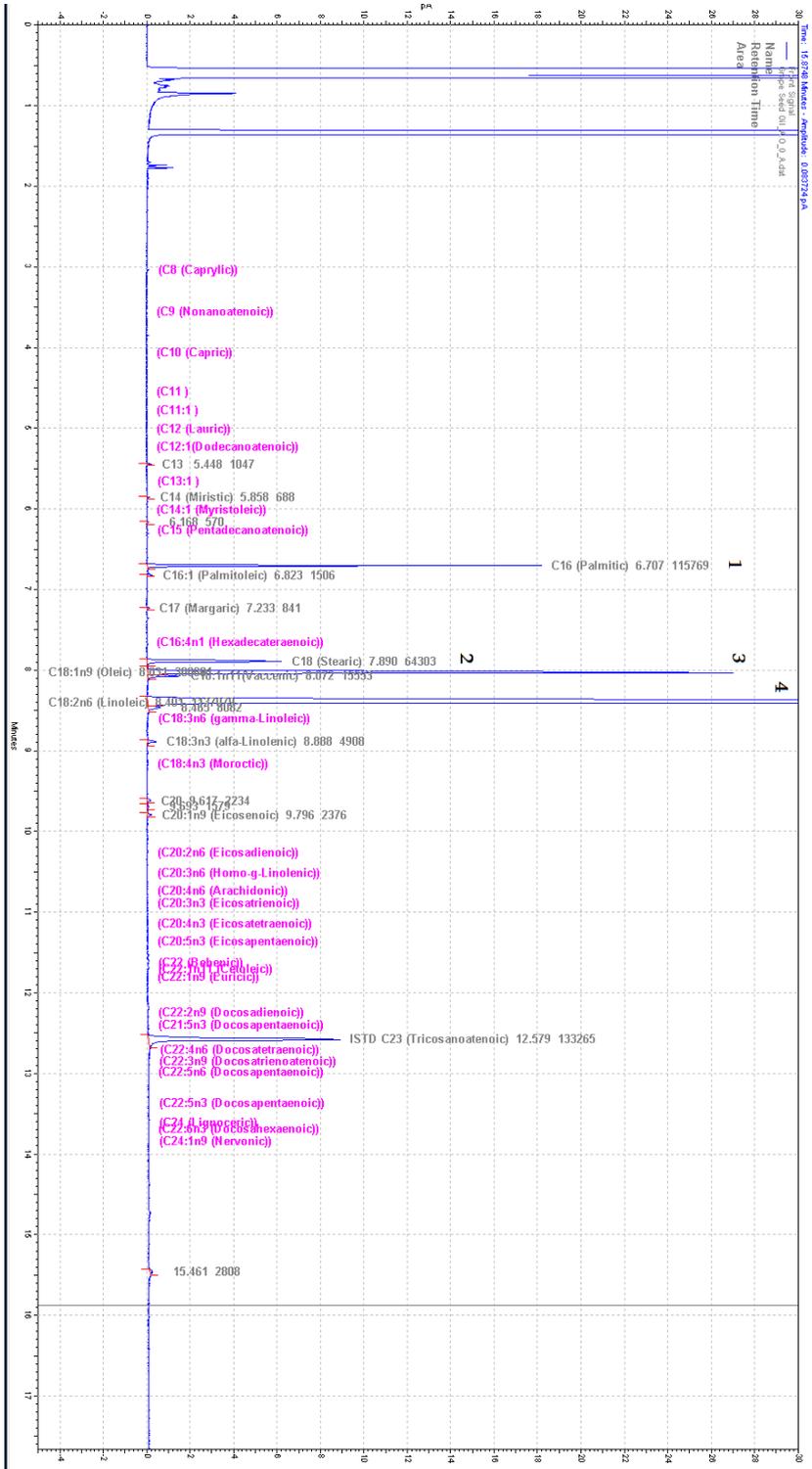


Figura 3.2. Cromatograma GLC del aceite de semilla de uva refinado. Principales picos: 1, ácido palmítico; 2, ácido esteárico; 3, ácido oleico; 4, ácido linoleico.

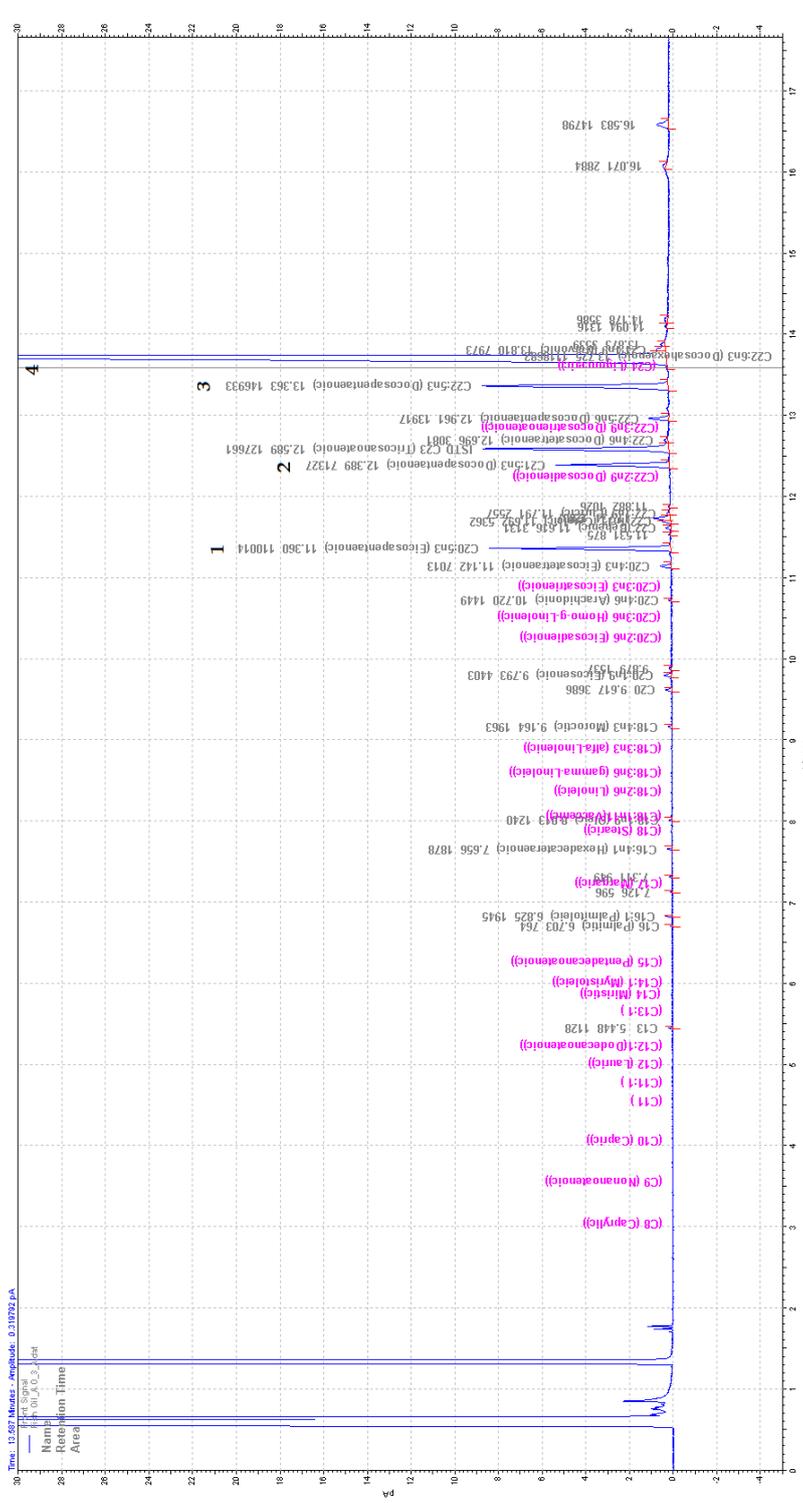


Figura 3.3. Cromatograma GLC del aceite de pescado rico en DHA. Principales picos: 1, ácido eicosapentaenoico; 2, ácido heneicosapentaenoico; 3, ácido docosapentaenoico; 4, ácido docosahexaenoico.

### 3.4. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este capítulo concluyen que:

1. El aceite de girasol alto oleico refinado analizado en este estudio presenta como ácido graso mayoritario el ácido oleico (n-9) en una proporción del 83%, seguido del ácido linoleico (n-6) que supone un 8% de su composición lipídica.
2. El aceite de semilla de uva refinado analizado en este estudio presenta como ácido graso mayoritario el ácido linoleico (n-6) en una proporción del 69%, seguido del ácido oleico (n-9) que supone un 18% de su composición lipídica.
3. El aceite de pescado enriquecido en DHA analizado en este estudio presenta como ácido graso mayoritario el ácido docosahexaenoico (n-3) en una proporción del 75% seguido de los ácidos docosapentaenoico (n-3) y eicosapentaenoico (n-3) que suponen un 10% y un 7% de su composición lipídica, respectivamente.
4. La selección de estos tres aceites para el posterior estudio de su resistencia a la oxidación lipídica, con y sin antioxidantes añadidos, ofrece la posibilidad de analizar el comportamiento de estas sustancias sobre aceites de distinta naturaleza en función de su composición mayoritaria en ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados: n-3, n-6 y n-9.

**Capítulo 4: Determinación de Capacidad  
Antilipoperoxidante frente a Oxidación  
Acelerada: Schaal Oven.**



## CAPÍTULO 4. DETERMINACIÓN DE CAPACIDAD ANTILIPOPEROXIDANTE FRENTE A OXIDACIÓN ACELERADA: SCHAAL OVEN.

### 4.1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La oxidación es uno de los parámetros de calidad más importantes de los aceites vegetales comestibles ya que determina su utilidad tanto en procesos tecnológicos, como en su vida útil, es decir, el tiempo de conservación, la palatabilidad, la calidad nutricional y la toxicidad de los aceites y grasas.

En la química alimentaria, se utilizan muchos métodos para determinar la estabilidad oxidativa de los aceites. La medición de la estabilidad oxidativa suele ser una tarea difícil ya que la oxidación a temperatura ambiente o a bajas temperaturas es un proceso lento. El ensayo más fiable y realista es el almacenamiento de los aceites junto con la determinación periódica del índice de peróxidos (IP) y el índice de *p*-anisidina (IA), ambos indicadores de la presencia de productos de oxidación primaria y secundaria respectivamente. La gran desventaja que presenta esta práctica es que requiere de demasiado tiempo. Debido a que el tiempo es crucial en la industria alimentaria, es deseable medir la estabilidad del aceite rápidamente durante la producción y antes del envío de los productos para su distribución. Esto se logra, generalmente, empleando condiciones de temperatura que aceleren el proceso de oxidación.

En este sentido, los métodos de oxidación acelerada más utilizados en la industria alimentaria son: el método Rancimat, método que abordaremos en capítulo siguiente, y el método de envejecimiento en estufa o Schaal Oven, que consiste en un análisis termostático de parámetros químicos indicadores de oxidación como: IP e IA. La prueba Rancimat determina la estabilidad a la oxidación de los aceites en un tiempo muy corto, sin embargo, se utilizan altas temperaturas (50-150°C) y una aireación intensiva, lo que puede cambiar la naturaleza del proceso de oxidación. En la prueba de envejecimiento en estufa, se aplican temperaturas más bajas (30-63° C) sin aireación intensa, lo que resulta en un tiempo de oxidación de la grasa de hasta varias semanas, pero la naturaleza de los cambios es más similar a los cambios en las condiciones naturales de almacenamiento (prueba de almacenamiento) (Maszewska *et al.*, 2018).

El IP es uno de los indicadores de calidad más utilizados en la industria alimentaria, y se han desarrollado varios métodos de análisis para medir el índice de peróxido de hidrógeno en aceites y grasas y en alimentos a base de aceites y grasas (Dobarganes & Velasco, 2002). A partir de este valor, se puede evaluar el momento de inicio de la fase de propagación de la cadena de radicales libres en la oxidación lipídica y la consecuente acumulación de hidroperóxidos. Sin embargo, no es posible utilizar sólo el IP para juzgar la calidad de los aceites comestibles, ya que los hidroperóxidos son intermediarios que se descomponen durante el almacenamiento originando compuestos más estables denominados compuestos de oxidación secundaria, entre otros, compuestos con funciones carbonilo, que confieren a las grasas los olores propios de la rancidez. Debido a que la velocidad de descomposición de los hidroperóxidos aumenta progresivamente a medida que aumenta el grado de oxidación, el proceso de descomposición puede tener lugar más rápidamente que la formación de nuevos hidroperóxidos, dependiendo de ciertas condiciones de almacenamiento como temperatura, luz o trazas de metales (Paschke & Wheeler, 1944). Puede suceder entonces que, aunque el aceite ya haya sufrido oxidación y se hayan formado consecuentemente niveles altos de productos de degradación, la velocidad de descomposición de los hidroperóxidos de como resultado niveles falsamente bajos de estos compuestos. En este caso, el valor de IP no nos ofrece una información fidedigna sobre la calidad real del producto. Sin embargo, el IP sí es un parámetro adecuado para medir el deterioro de la calidad a lo largo del tiempo ya que, después del período de inducción, durante el cual este parámetro aumenta lentamente, un fuerte aumento indica que el aceite se ha deteriorado (B. Matthäus, 2010).

En general, el objetivo de la industria alimentaria es producir aceites con los valores de IP más bajos posibles, sin la formación de productos de reacción secundarios. Un valor de IP alto al principio del período de almacenamiento tiene un efecto negativo en la estabilidad de almacenamiento del aceite. Para los aceites refinados, los productores deben aspirar a un valor de IP inferior a 1, mejor 0,5 meq O<sub>2</sub>/Kg de aceite, mientras que el valor de IP para los aceites vírgenes puede ser mayor, hasta 3 meq O<sub>2</sub>/Kg de aceite (B. Matthäus, 2010).

El IA cuantifica el número productos secundarios de oxidación de compuestos lipídicos que se forman debido a la descomposición de hidroperóxidos, principalmente 2-alquenos y 2,4-alcadienos, y es más sensible a los aldehídos insaturados. Dado que el IA representa el contenido de productos de oxidación secundaria, se utiliza en lugar de, o junto con, el IP para evaluar grasas y aceites (X. Yang & Boyle, 2016).

No todos los compuestos carbonilo contribuyen de igual manera en la determinación del valor de IA, por lo que este ensayo no llega a ofrecer un valor numérico exacto del contenido de dichos compuestos, ni una medida directa del sabor de una grasa ni de su estabilidad. A pesar de esto, el análisis de IA resulta muy útil para conocer en estado de oxidación real de un aceite (Majchrzak, Wojnowski, Dymerski, Gębicki, & Namieśnik, 2018).

Un parámetro valioso para evaluar la calidad de los aceites comestibles es el valor de oxidación total o Totox, ya que tiene en cuenta el estado real del producto (utilizando el IP) así como el historial del aceite (utilizando el IA). Por lo tanto, la importancia del valor de Totox puede llegar a ser más importante que los valores individuales de estos dos índices de oxidación. Aunque el método para el valor de IA y el cálculo del valor de Totox se conocen desde hace mucho tiempo, por el momento ninguna norma oficial define un límite para estos valores con el fin de garantizar la calidad de los aceites comestibles (B. Matthäus, 2010).

Algunos autores no están de acuerdo con la fuerte preferencia de los productos de reacción primarios en la fórmula de Totox, porque no se ha desarrollado una correlación fiable entre la reducción del valor de peróxido y el aumento simultáneo del valor de anisidina (Strecker, Maza, & Winnie, 1990). Un argumento es que, esta sobrevaloración del índice de peróxido lleva a la conclusión de que el estado oxidativo del aceite puede mejorarse simplemente mediante la exposición a altas temperaturas, lo que conduce a una reducción del índice de peróxido y, consecuentemente, del índice de oxidación total Totox (B. Matthäus, 2010).

En relación con las tres matrices alimentarias (aceite de girasol alto oleico, aceite de semilla de uva y aceite de pescado) y los doce compuestos antioxidantes estudiados en esta memoria, los objetivos de este capítulo fueron los siguientes:

- Estudiar la capacidad estabilizadora frente a la formación de productos primarios de oxidación con el tiempo a diferentes temperaturas de almacenaje.
- Estudiar la capacidad estabilizadora frente a la formación de productos secundarios de oxidación con el tiempo a diferentes temperaturas de almacenaje.
- Estimar la capacidad estabilizadora frente a la oxidación lipídica total con el tiempo a diferentes temperaturas de almacenaje.
- Comparar la capacidad estabilizadora frente a la formación de productos de oxidación primarios y secundarios de los distintos extractos de romero sobre cada matriz alimentaria estudiada, con el fin de evaluar la posible influencia de la relación entre las concentraciones de CA y COL sobre la capacidad de cada extracto para retardar la formación de estos productos de oxidación lipídica.

## 4.2. MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.2.1. Material

#### 4.2.1.1. Reactivos

- Cloroformo (163101.1612-PanReac)
- Ácido acético glacial (AC03442500- Scharlau)
- Tiosulfato de sodio 0,01N (182577.1211-PanReac)
- Ioduro potásico (131542.1209-PanReac)
- Almidón soluble (121096.1211-PanReac)
- Isooctano (322064.1612-PanReac)
- *p*-anisidina (A88255- Sigma Aldrich)

#### 4.2.1.2. Antioxidantes

Las sustancias antioxidantes empleadas para estudiar su efecto sobre la resistencia de las matrices lipídicas a la oxidación acelerada en estufa a temperaturas de 40 y 60°C, se describen a continuación organizados en tres grupos:

- 1- Grupo de antioxidantes sintéticos (SIN), que incluye:
  - Butilhidroxianisol (BHA).
  - Butilhidroxitolueno (BHT).
  - *Terc*-butilhidroquinona (TBHQ).
  - Palmitato de ascorbilo (PA).
- 2- Grupo de extractos de romero (ROM), que incluye:
  - Extracto de romero 1 (RE1).
  - Extracto de romero 2 (RE2)
  - Extracto de romero 3 (RE3)
  - Extracto de romero 4 (RE4)
  - Extracto de romero 5 (RE5)

3- Grupo de otros antioxidantes naturales (NAT), que incluye:

- Extracto natural de tocoferoles (TOC)
- Extracto de Oliva (EO)
- Extracto de semilla de uva (GSE)

Tanto la caracterización como la procedencia de los antioxidantes y extractos comerciales incluidos en este capítulo, así como los procesos de extracción y cuantificación cromatográfica de principios activos antioxidantes (PAA) en el caso de los extractos vegetales, se describen con detalle en el capítulo 1.

#### *4.2.1.3. Matrices alimentarias*

Las matrices lipídicas empleadas para estudiar su resistencia a la oxidación acelerada en estufa a temperaturas de 40 y 60°C, fueron las siguientes:

- Aceite de girasol alto oleico (GIR)
- Aceite de semilla de uva (SEM)
- Aceite de pescado (PES)

Tanto la caracterización lipídica como la procedencia de estos tres aceites se describen con detalle en el capítulo 3.

### **4.2.2. Método de envejecimiento acelerado en estufa**

#### *4.2.2.1. Fundamento*

El ensayo de oxidación acelerada, denominado en inglés como Schaal Oven, es un método termostático que consiste en almacenar dentro de una estufa durante varios días las muestras de aceites o matrices alimentarias. Las muestras se mantienen a una temperatura constante y controlada, por encima de la temperatura ambiente, normalmente entre 40 y 60°C. Dicho aumento de temperatura actúa como un catalizador acelerando las reacciones de oxidación, permitiendo así medir su evolución, tanto organolépticamente (color, olor, sabor, etc.) como por análisis químicos (Talbot, 2016).

#### 4.2.2.2. Procedimiento

Se prepararon muestras de los tres aceites con los distintos antioxidantes aplicados a idéntica concentración de PAA (100 ppm) y muestras de los tres aceites sin antioxidante añadido (blanco). Al tratarse de aceites puros, nuestras muestras no necesitaron acondicionamiento previo, solo la disolución de los antioxidantes en los distintos aceites. Para ello se preparó para cada sustancia una disolución madre de aceite con una concentración de 1000 ppm de PAA, pesando la cantidad de antioxidante bruto necesaria en función de su concentración de PAA. Esta disolución madre se sometió a agitación magnética sellada con Parafilm durante 30 min. A partir de esta disolución madre se preparó la disolución a 100 ppm para cada antioxidante. Cada muestra de aceite fue pesada (20 g por muestra) y envasada en botes de cristal topacio de 30 cc de capacidad cerrados que fueron previamente inertizados mediante un flujo de N<sub>2</sub>.

Para cada aceite se envasó el número de muestras necesario que permitiese disponer de tres botes de muestra nuevos (sin haber sido previamente abiertos desde su envasado inicial) para cada antioxidante, cada día de análisis.

Estas muestras se almacenaron en estufa a 40 y 60°C, y se realizaron análisis de compuestos primarios (IP) y secundarios (IA) de oxidación de manera periódica para evaluar la evolución de estabilidad de cada una de ellas. A partir de los resultados de IP e IA se calculó el valor Totox para estimar el estado general de oxidación de un aceite.

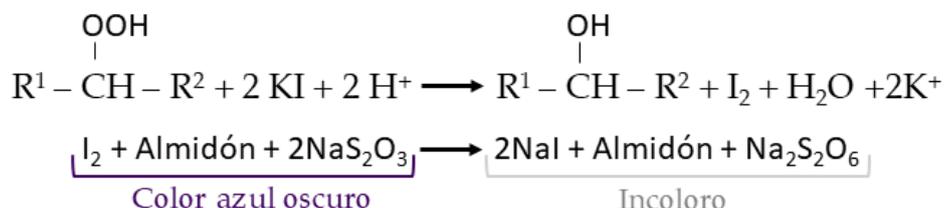
- ✓ Envejecimiento acelerado en estufa a 40°C, se realizó en dos fases:
  - En una primera fase se realizaron análisis de IP e IA sobre las muestras de los tres aceites (muestras control y muestras con antioxidante añadido) en el momento inicial de la prueba (tiempo 0) y cada semana durante cinco semanas (tiempos: 7, 14, 21, 28 y 35 días).
  - Tras las cinco semanas de duración de la primera fase, las muestras se mantuvieron en la estufa a 40°C durante cinco meses más. Transcurrida esta segunda fase, se midieron de nuevo los parámetros IP e IA (tiempo 150 días).
  - A partir de los parámetros IP e IA se calculó el valor TOTOX (tiempos: 0, 7, 14, 21, 28, 35 y 150 días).

- ✓ Envejecimiento acelerado a 60°C:
  - En la prueba de estabilidad a 60°C, los análisis de IP, IA se realizaron al inicio de la prueba (tiempo 0) y a las 5 semanas (tiempo 35 días).

### 4.2.3. Método de determinación de índice de peróxidos (IP)

#### 4.2.3.1. Fundamento

El IP determina la concentración de hidroperóxidos, los productos primarios de oxidación. La determinación se llevó a cabo siguiendo el método oficial AOCS Cd 8-53 (AOCS, 2003), que cuantifica las especies capaces de oxidar el yoduro potásico bajo determinadas condiciones de reacción. En el proceso, los peróxidos son reducidos por el yoduro potásico liberando yodo que es posteriormente valorado con tiosulfato sódico, empleando almidón como indicador (Figura 4.1).



**Figura 4.1.** Determinación de índice de peróxidos.

La cantidad de peróxidos se calcula en función de la cantidad de tiosulfato de sodio consumida en la valoración de la muestra y se expresa en unidades de miliequivalentes de peróxido (meq) /Kg de grasa.

#### 4.2.3.2. Procedimiento

El ensayo se realizó siempre con luz artificial. Para pesar las muestras se empleó matraz Erlenmeyer de 200 mL previamente inertizado con N<sub>2</sub> y sellado con Parafilm. El cloroformo y el ácido acético empleados fueron sometidos previamente a borboteo de N<sub>2</sub> para eliminar O<sub>2</sub>. La solución de yoduro potásico saturada se preparó diariamente disolviendo por agitación magnética 14,3 g del

reactivo en 100 mL de agua destilada. La solución indicadora de almidón se preparó diariamente al 1%. Para ello se llevó el agua destilada a ebullición en una placa calefactora, se añadió el almidón y se sometió a agitación magnética hasta su completa disolución. Para la valoración volumétrica el método oficial recomienda emplear una disolución 0,002 N de tiosulfato sódico para IP inferiores a 12 y 0,01 N si se presuponen resultados de IP superiores a 12. Para preparar las diluciones con estas concentraciones se partió de una disolución comercial de tiosulfato sódico 0,1N.

Según las especificaciones del método, para cada análisis se pesó una cantidad de muestra en función del IP presupuesto (ver Tabla 4.1).

**Tabla 4.1.** Cantidad de muestra pesada para análisis de índice de peróxidos.

Aceite	IP a 40°C		IP a 60°C
	0-35 días	150 días	0-35 días
Aceite Girasol-AO	2-3 gr	0,5-1 gr	1-1,5 gr
Aceite Semilla Uva	2-3 gr	0,5-1 gr	0,8-1 gr
Aceite Pescado	3-4 gr	3-4 gr	3-4 gr

Cada muestra se pesó en un matraz y se disolvió en 10 mL de cloroformo mediante agitación manual. Tras este paso, se añadieron 15 mL de ácido acético glacial y, a continuación, 1 mL de la disolución saturada de yoduro potásico. El matraz se selló con papel Parafilm inmediatamente, se sometió a un minuto de agitación magnética y se mantuvo en oscuridad durante 5 min. Transcurrido este tiempo, se añadieron 75 mL de agua destilada y se procedió a valorar la mezcla sometida a vigorosa agitación con la solución de tiosulfato sódico, utilizando como indicador la solución de almidón. Cada experimento se realizó por triplicado.

Para comprobar que los reactivos y disolventes estaban en buen estado, cada día de análisis se realizó un ensayo en blanco (las especificaciones del método indican que, si para valorar el ensayo en blanco se necesitan más de 0,05 mL de la

solución de tiosulfato sódico 0,01 N, se deben sustituir los reactivos). Esto no fue necesario ninguno de los días de análisis.

#### 4.2.3.3. Expresión de resultados

$$IP = \frac{V \times N \times 1000}{P}$$

Los resultados se expresaron en miliequivalentes de oxígeno activo por Kg de grasa y fueron calculados mediante la siguiente fórmula:

Siendo:

V: mL de solución de tiosulfato sódico empleados en la valoración, convenientemente corregidos para tener en cuenta el ensayo en blanco.

N: normalidad exacta de la solución de tiosulfato sódico empleada.

P: peso de la muestra en gramos.

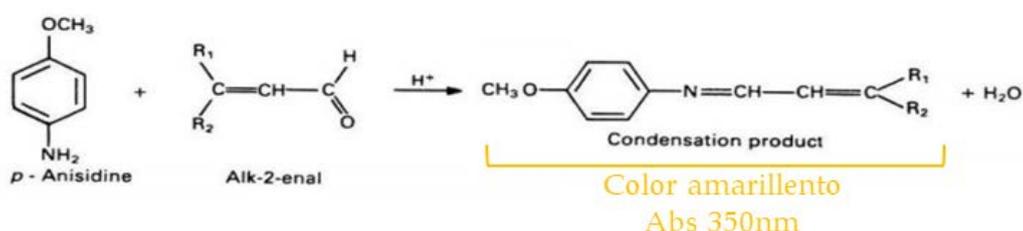
#### 4.2.4. Método de determinación de índice de *p*-anisidina (IA)

##### 4.2.4.1. Fundamento

El índice de *p*-anisidina (IA) determina la cantidad de aldehídos, principalmente 2-alquenos y 2,4-alcadienos. Estos productos se consideran los compuestos secundarios de oxidación ya que son generados por la descomposición de los hidroperóxidos (compuestos de oxidación primaria) y responsables de los olores a rancidez característicos de los aceites y grasas deterioradas.

Para la determinación de IA se empleó el método oficial AOCS Cd 18-90 (AOCS, 2009a), según el cual, el valor de *p*-anisidina se define como 100 veces la densidad óptica medida a 350 nm en una cubeta de 1 cm de una solución que contiene 1,00 g de aceite en 100 mL de una mezcla de disolvente y reactivo. El principio de este método se basa en la reacción de los compuestos aldehídicos de un aceite con la *p*-anisidina en una solución de ácido acético. Esta reacción resulta en productos de color amarillentos que presentan absorbancia a 350nm (Figura 4.2).

La intensidad del color de los productos formados no depende exclusivamente de la cantidad de compuestos aldehídicos presentes, sino que influye también la estructura de los mismos. La presencia de un doble enlace en la cadena carbonatada, conjugado con el doble enlace del grupo carbonilo, aumenta la absorbancia molar en 4 ó 5 veces. Por este motivo los 2-alquenes son los que contribuyen prioritariamente al valor de IA (Grompone, 1991).



**Figura 4.2.** Determinación de índice de *p*-anisidina. Imagen modificada de: (X. Yang & Boyle, 2016)

#### 4.2.4.2. Procedimiento

Se preparó una disolución a una concentración del 0,25% de *p*-anisidina en ácido acético glacial.

Se pesaron entre 0,5 y 4 g de muestra en un matraz aforado y se diluyó con isooctano enrasando hasta los 25 mL. Se midió la absorbancia ( $A_b$ ) de esta disolución a 350 nm en una cubeta de cuarzo de 1 cm en un espectrofotómetro (UV-1700, Shimadzu) utilizando isooctano como blanco.

En un tubo de cristal con tapón de rosca se pipetearon exactamente 5 mL de la disolución de la muestra y 5 mL de isooctano en un segundo tubo. A cada uno de los tubos se añadió después 1 mL de la dilución de *p*-anisidna, se taparon y se agitaron.

Después de 10 min se midió la absorbancia a 350 nm ( $A_B$ ) de la disolución del primer tubo (disolución de muestra más *p*-anisidina) empleando como blanco la disolución del segundo tubo (isooctano más *p*-anisidina). Cada experimento se realizó por triplicado.

#### 4.2.4.3. Expresión de resultados

Los resultados del IA se calcularon empleando la siguiente fórmula:

$$IA = \frac{25 \times (1,2 A_B - A_b)}{m}$$

Siendo:

$A_b$ : absorbancia de la dilución de la muestra.

$A_B$ : absorbancia de la dilución de la muestra después del tiempo de reacción con *p*-anisidina.

$m$ : masa de la muestra en gramos.

#### 4.2.5. Determinación de oxidación total (Totox)

Si bien el IP es una medida muy usada para la determinación de la oxidación lipídica, su utilidad está limitada a las etapas iniciales ya que los hidroperóxidos son compuestos muy inestables y se descomponen rápidamente a través de la escisión del enlace C-C para generar productos de oxidación secundaria, como aldehídos, alcoholes o hidrocarburos. Un IP bajo, por tanto, puede indicar o bien que ha habido poca oxidación lipídica, o bien que la reducción de los peróxidos por algún proceso enmascare su deterioro real.

Un parámetro valioso para evaluar la calidad de los aceites comestibles es el valor de Totox (Wai, Saad, & Lim, 2009), que combina el IP y el IA.

El valor Totox se determinó para todas las muestras sometidas a oxidación acelerada en estufa a partir de las determinaciones de IP e IA aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Totox} = 2 \times \text{IP} + \text{IA}.$$

#### 4.2.6. Método de análisis estadístico

Se realizó un análisis de la importancia relativa de cada factor experimental (aceite, antioxidante, día y repetición) en cada uno de los parámetros a estudiar (IP, IA, Totox) mediante descomposición de la varianza y análisis del coeficiente R<sup>2</sup>. El factor repetición tiene una importancia despreciable ( $R^2 < 0.001\%$  en los tres parámetros), con lo cual se decidió obviarlo tomando la media de las tres repeticiones en cada experimento.

Para cada antioxidante y aceite y parámetro a estudiar (IP, IA, Totox) se realizó un modelo de regresión lineal para estimar el incremento medio por día del parámetro durante los primeros 35 días del experimento. Se utilizaron pruebas t-Student para estimar los incrementos del parámetro entre los días 0 y 35, y entre los días 0 y 150 en el experimento a 40°C, así como entre los días 0 y 35 en el experimento a 60°C. Todas las estimaciones se realizaron con intervalos del 95% de confianza.

Para cada aceite y parámetro de interés se compararon las pendientes estimadas para cada antioxidante con el experimento blanco (sin antioxidante). Los incrementos estimados entre dos días concretos también fueron comparados entre distintos antioxidantes. Todas las comparaciones se realizaron con pruebas t-Student no penalizadas y se presentó el nivel de significación.

### 4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.3.1. Envejecimiento acelerado en estufa a 40°C

A través de la evaluación del IP durante un primer periodo de 35 días (5 semanas) y un segundo periodo de hasta 5 meses (21 semanas) es posible obtener ciertas conclusiones acerca de la actividad antioxidante primaria de los compuestos estudiados en la presente memoria, en definitiva, de su capacidad para bloquear, captar, etc., compuestos de tipo hidroperóxido generados en las primeras etapas oxidativas de estos aceites. De cualquier forma, consideremos que las condiciones de T<sup>a</sup> empleadas en este primer ensayo de estabilidad (40°C), son condiciones relativamente suaves.

En la prueba de estabilidad a 40 °C, se realizaron análisis de IP e IA sobre las muestras de los 3 aceites en el momento inicial de la prueba (tiempo 0), cada semana durante 5 semanas (tiempos: 7, 14, 21, 28 y 35 días) y a los 5 meses (tiempo 150 días). A partir de estas dos determinaciones se cuantificó también el valor de Totox para cada día de medida.

Para la descripción e interpretación de los resultados obtenidos en esta prueba de estabilidad a 40°C para cada uno de los aceites estudiados, se realizaron tres tipos de gráficas cuya interpretación se explica continuación con detalle, con el fin de facilitar al lector su comprensión e interpretación.

**I.-Gráficas de evolución del parámetro analizado (IP, IA o Totox) a lo largo de los días para cada uno de los antioxidantes y el blanco.** Cada una de estas gráficas se dividió en tres subgráficas correspondientes a los tres grupos de antioxidantes estudiados en nuestra memoria: sintéticos, romeros, otros naturales. Para cada curva de evolución de parámetro (IP, IA o Totox) se calculó, por regresión lineal, la correspondiente recta de tendencia cuya pendiente indica la evolución del valor del parámetro (IP, IA o Totox) /día. Con el fin de conocer el efecto de cada antioxidante sobre la velocidad de formación de productos primarios de oxidación en los primeros 35 días de envejecimiento, fueron comparadas las pendientes de las rectas obtenidas para cada antioxidante respecto a la pendiente del aceite control (blanco). Para ello, se añadieron en la leyenda de

cada gráfico las pendientes de cada una de las rectas con su intervalo de confianza al 95% y el p-valor resultante de la comparación de la pendiente de cada recta de antioxidante respecto a la pendiente de la muestra control sin antioxidante (blanco). Este es el tipo de gráficas que vemos reflejadas en las Figuras: 4.3, 4.8, 4.11, 4.14, 4.17, 4.20, 4.23, 4.26, 4.29.

**II-Gráficas de análisis comparativo de todas las pendientes de las rectas obtenidas a partir de la curva de evolución de cada parámetro (IP, IA o Totox) para cada antioxidante y para el control (blanco).** El objetivo en esta gráfica es comparar las pendientes previamente descritas, ya no solo respecto al blanco, sino entre los distintos antioxidantes, así como valorar el orden de efectividad de las sustancias en cada uno de los aceites. En este tipo de gráfica, se ordenaron los antioxidantes en orden ascendente de su pendiente en la columna de la izquierda. En el eje de abscisas se representó la pendiente correspondiente a cada antioxidante, es decir la velocidad de evolución de parámetro (IP, IA o Totox) / día, y fueron coloreadas de acuerdo con el grupo de antioxidantes al que pertenecen: sintéticos, romeros u otros naturales. En la columna de la derecha se describió el valor medio de la pendiente, junto con su intervalo de confianza al 95% entre paréntesis. Incluimos en el gráfico mediante una leyenda el p-valor obtenido al comparar cada antioxidante con el resto del siguiente modo:

- Empezamos a leer el gráfico por el antioxidante con menor pendiente (primera fila desde abajo en el gráfico). Realizamos un test con cada uno de los once antioxidantes que tienen mayor pendiente que él para ver si la pendiente del primer antioxidante es estadísticamente diferente al resto de antioxidantes. De cada uno de esos test se obtuvo un p-valor y para cada  $p < 0,05$  pusimos un punto de un color determinado en la fila del primer antioxidante, justo debajo de la pendiente del antioxidante con el que lo comparamos. Coloreamos el punto con distintos colores que indican diferentes tamaños del p-valor, es decir, distintos tamaños de evidencia estadística. De este modo, como máximo habrá once puntos a lo largo de la primera fila, en el caso de que el primer antioxidante muestre diferencias estadísticamente significativas con los once antioxidantes restantes, la ausencia de punto indica que la diferencia de pendientes no fue estadísticamente significativa.

- Del mismo modo pasamos a leer los resultados del siguiente antioxidante con menor pendiente (segunda fila del gráfico empezando por abajo) y realizamos la misma operación comparando con los diez antioxidantes que presentaron mayor pendiente que él, es decir, los diez que quedan por encima de él en el gráfico. No será necesario comparar con los antioxidantes de menor pendiente (los que quedan por debajo de él en el gráfico) porque ya lo habremos hecho previamente en las filas de abajo.

- De este modo, finalmente obtuvimos un área llena de puntos por debajo de los efectos de los antioxidantes. Leyendo la fila y la columna de cada punto es posible reconocer los antioxidantes donde tenemos evidencia estadística de que sus pendientes son distintas. Este el tipo de gráficas que vemos reflejadas en las Figuras: 4.4, 4.9, 4.12, 4.15, 4.18, 4.21, 4.24, 4.27 y 4.30.

**III-Gráficas de análisis comparativo de diferencia entre día 0 y día 150 de cada parámetro (IP, IA o Totox) para cada antioxidante y para el control (blanco).** Esta gráfica es idéntica a la anterior en cuanto su modo de lectura e interpretación. En este caso lo que se compara es la diferencia del valor obtenido para cada parámetro (IP, IA o Totox) a tiempo 0 y a los 5 meses (150 días) entre los distintos antioxidantes y el blanco. Este el tipo de gráficas que vemos reflejadas en las Figuras: 4.6, 4.10, 4.13, 4.16, 4.19, 4.22, 4.25, 4.28 y 4.31.

Los resultados numéricos de todos los análisis realizados durante todo el proceso de envejecimiento en estufa a 40°C pueden consultarse en las tablas contenidas en los Anexos 4.1, 4.2 y 4.3.

#### *4.3.1.1. Aceite de girasol*

#### Índice de peróxidos

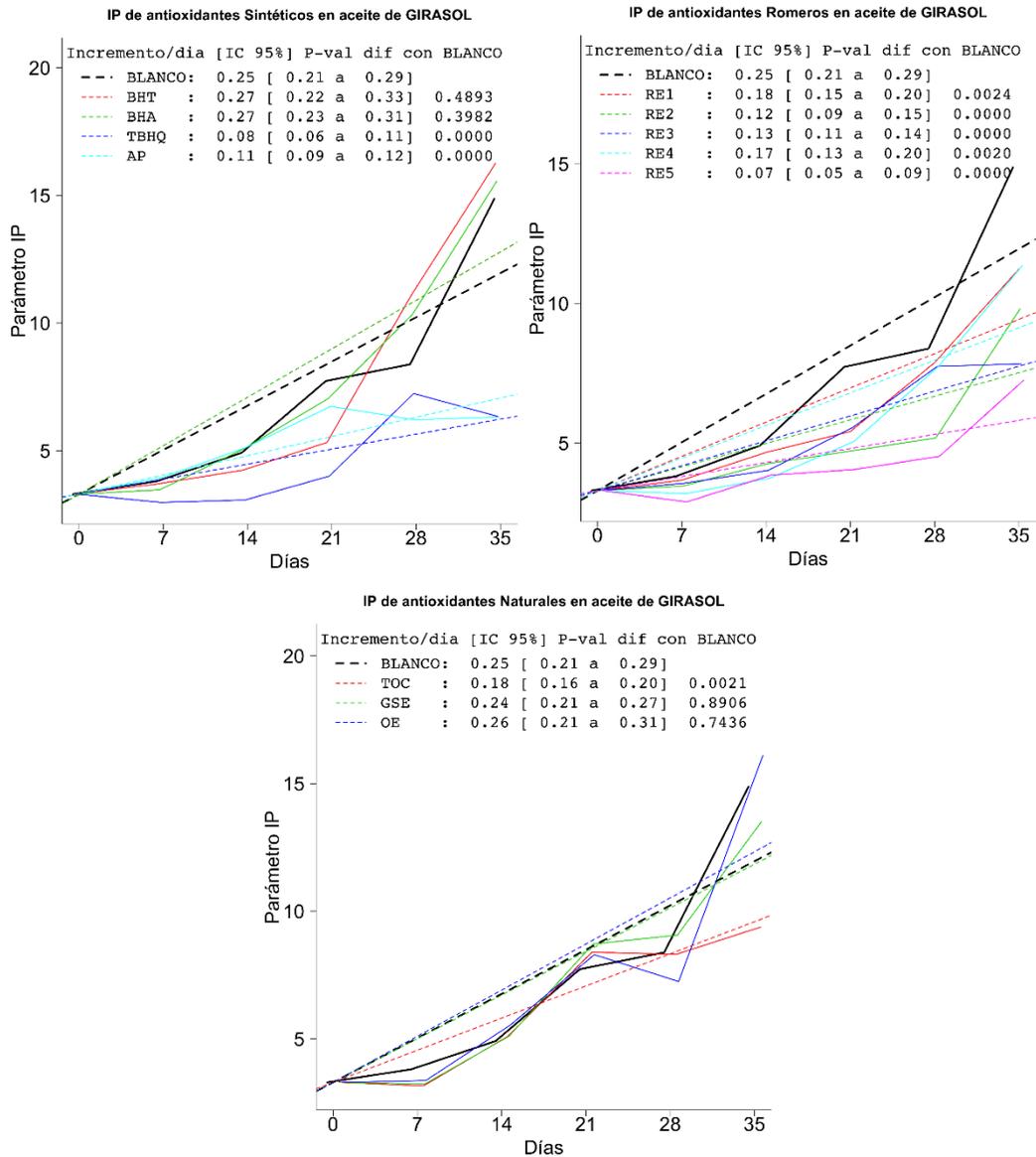
En las gráficas representadas (Figura 4.3) observamos que, en todas las muestras estudiadas la evolución del IP en GIR muestra una fase de latencia más o menos prolongada, que varía desde los 14 días en la muestra control hasta los casi 35 días en el caso de tres compuestos: THBQ, AP y RE5. Esta fase de latencia del

valor de IP, en general, desaparece al cabo de 21 días, iniciando un incremento progresivo con mayor o menor pendiente en cada uno de los compuestos estudiados.

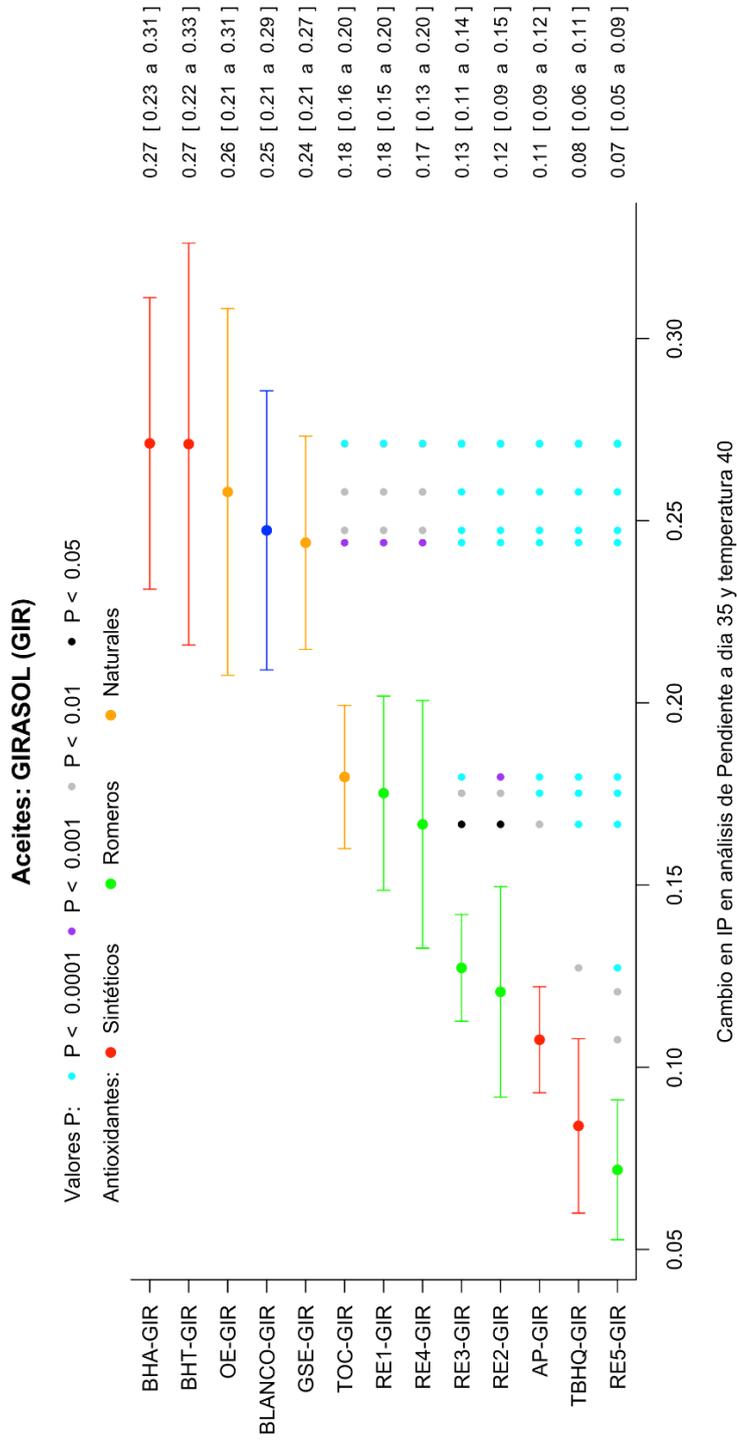
Dentro del grupo de antioxidantes sintéticos, los resultados obtenidos en la evolución de IP se reflejan en la Figura 4.3. Comparando el incremento del parámetro IP/día (es decir, la pendiente de la recta de regresión lineal) de la muestra control (0,25/día) con el incremento IP/día de las muestras con antioxidantes, observamos que los compuestos BHT (0,27/día) y BHA (0,27/día), no presentan capacidad antioxidante en este ensayo, mostrando un perfil de evolución de IP idéntico al del aceite control sin antioxidantes (blanco). Sin embargo, los dos antioxidantes AP (0,11/día) y TBHQ (0,08/día) son los que muestran mejores resultados en cuanto a esta actividad, incluyendo un comportamiento muy similar en la evolución del valor de IP durante los 35 días, no solo en el valor del índice final. La capacidad de estos dos compuestos de reducir la velocidad de formación de hidroperóxidos respecto al blanco es estadísticamente muy significativa ( $p < 0,001$  para ambos antioxidantes).

Dentro del grupo de los extractos de romero (Figura 4.3) observamos que, todos ellos reducen de manera muy significativa la velocidad de formación de hidroperóxidos respecto al blanco ( $p < 1e-04$  para RE2, RE3 y RE5;  $p < 0,01$  para R4 y RE1). Los extractos RE5 (0,07/día), RE2 (0,12/día) y RE3 (0,13/día) presentan mayor capacidad para reducir la velocidad de formación estos compuestos que los extractos RE4 (0,17/día) y RE1 (0,18/día).

Dentro del grupo de otros antioxidantes naturales (Figura 4.3) encontramos que los extractos GSE (0,24/día) y OE (0,26/día) no presentan capacidad antioxidante en este ensayo, mostrando un perfil de IP idéntico al del aceite control sin antioxidantes (blanco). El antioxidante TOC (0,18/día) muestra un comportamiento también idéntico al del aceite control, pero el valor de IP muestra a los 35 días una significativa reducción respecto al blanco ( $p < 0,01$ ).



**Figura 4.3.** Evolución del parámetro IP a lo largo de 35 días y tendencia (estimada con regresión lineal) para cada antioxidante y el blanco en el aceite de girasol alto oleico envejecido a 40°C. En el eje de abscisas se representa el tiempo de envejecimiento (días) y en el de ordenadas se representa IP (meq O<sub>2</sub>/Kg grasa). En la leyenda se refleja para cada antioxidante: la pendiente de la recta (incremento IP/día), su intervalo de confianza al 95% y el p-valor de la diferencia estadística de cada antioxidante respecto al blanco.



**Figura 4.4.** Gráfica comparativa del efecto de los distintos antioxidantes estudiados sobre la velocidad de formación de hidroperóxidos (pendiente) en el aceite de girasol alto oleico envejecido a 40°C. En el eje de ordenadas se muestran los antioxidantes ordenados ascendientemente en función del tamaño de su pendiente. En el eje de abscisas se representa el efecto de cada antioxidante expresado como incremento de IP/día. A la derecha se describe el valor medio de la pendiente junto con su intervalo de confianza al 95% entre paréntesis.

Al realizar un análisis estadístico comparativo entre todas las sustancias antioxidantes estudiadas (Figura 4.4), primeramente, observamos que, el extracto RE5 (0,7/día), cuyo PAA mayoritario es CA, junto con el TBHQ (0,08/día) son las sustancias que presentan mayor capacidad para retardar la formación de hidroperóxidos en esta primera etapa de envejecimiento de GIR a 40°C.

Los otros cuatro RE y el AP son los siguientes compuestos que manifiestan mejor respuesta, siendo la velocidad de formación de IP de AP (0,11/día) y los dos extractos RE2 (0,12/día) y RE3 (0,13/día) significativamente inferior a la de los dos extractos RE4 (0,17/día) y RE1 (0,18/día), ( $p < 0,05$  y  $p < 0,01$  respectivamente).

A continuación, encontramos que TOC (0,18/día) presenta cierto efecto sobre la velocidad de formación de hidroperóxidos respecto al blanco ( $p < 0,01$ ). El resto de los antioxidantes, GSE, OE, BHT y BHA, no manifiestan efecto alguno sobre la disminución de IP en GIR y no muestran diferencia estadísticamente significativa entre ellos.

El estudio de la evolución del IP se extendió hasta los 5 meses (150 días) en las mismas condiciones de temperatura.

Antes de describir estos resultados es conveniente realizar una consideración mecanística. Sabemos, como ya hemos mencionado, que este índice nos suministra información acerca de la primera etapa en la oxidación de ácidos grasos, la formación de hidroperóxidos insaturados. También sabemos que, estos compuestos pueden ser intermedios transitorios que posteriormente, y en función de las condiciones de oxidación, pueden dar lugar a la generación de compuestos con grupos carbonilo (mayoritariamente aldehídos), que a su vez pueden catalizar oxidaciones posteriores o descomponerse en compuestos organolépticamente indeseables. Este segundo proceso de oxidación no puede evaluarse a través del IP, sino empleando el denominado índice de anisidina (IA) (Figura 4.5).

En consecuencia, el valor de IP puede evolucionar de varias formas, siempre en función de las condiciones de oxidación a las que se vea sometido el aceite: seguir aumentando progresivamente a una determinada velocidad, mantenerse constante o, incluso, disminuir con el tiempo. Estos diferentes comportamientos son el resultado de la aparición y/o progresión de la segunda cascada oxidativa que acabamos de mencionar. Es evidente que, desde el primer momento pueden

estar generándose ambos tipos de compuestos, hidroperóxidos y compuestos carbonilo y que la evolución de los valores del IP y del IA, que estudiaremos posteriormente, dependerá de la cinética y progresión de cada una de ellas y, en consecuencia, de la relación entre ambas.

### Oxidación lipídica (ROO·)

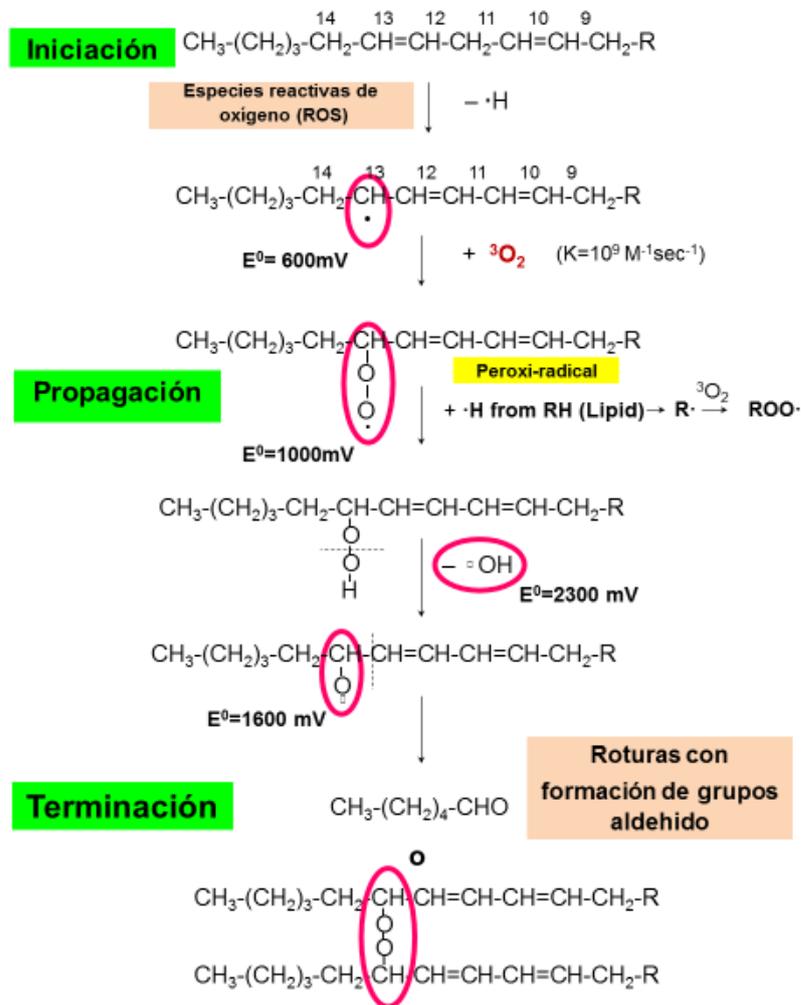
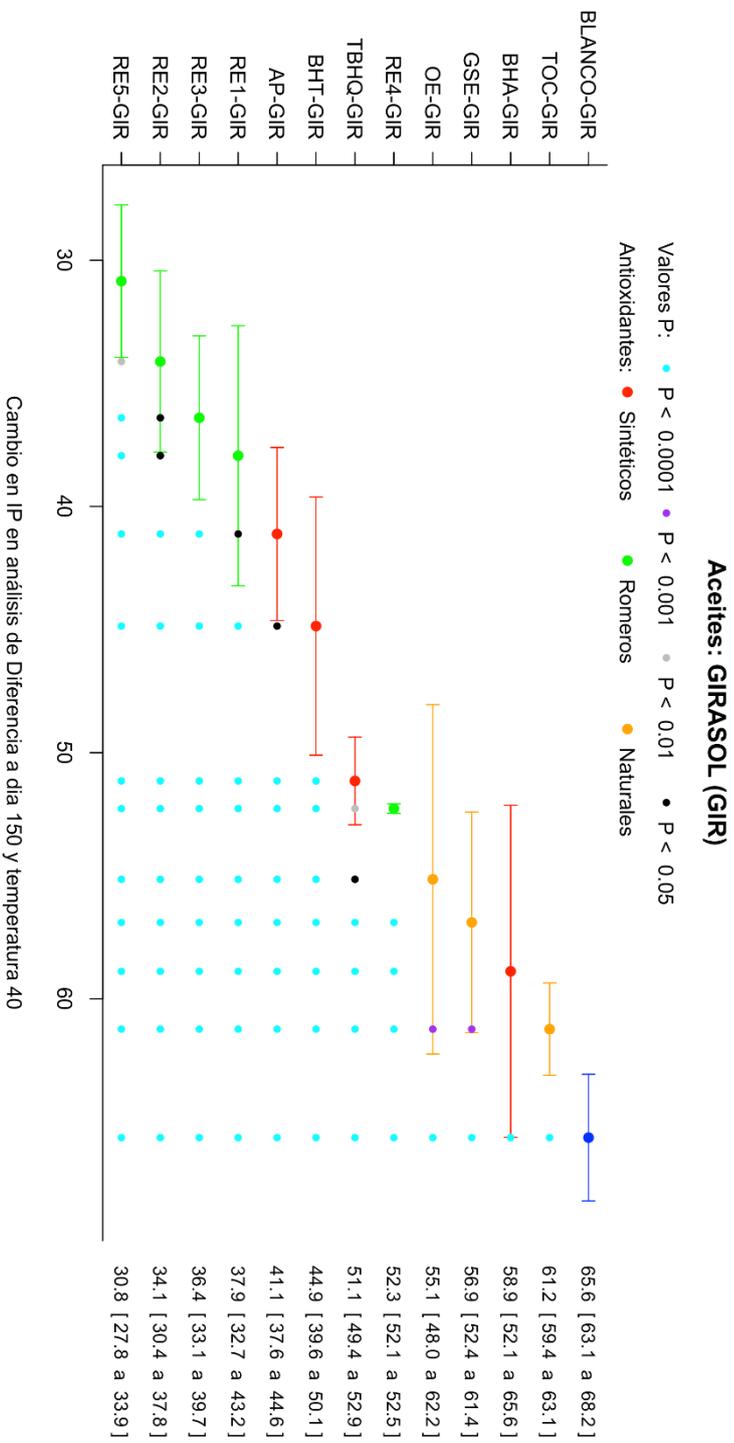


Figura 4.5. Mecanismo de peroxidación lipídica.



**Figura 4.6.** Gráfica comparativa del efecto de los distintos antioxidantes estudiados sobre el incremento del parámetro IP entre tiempo 0 y 150 días en el aceite de girasol alto oleico envejecido a 40°C. En el eje de ordenadas se muestran los antioxidantes ordenados ascendientemente en función del incremento de IP. En el eje de abscisas se representa el incremento de IP para cada antioxidante. A la derecha se describe el valor medio del incremento de IP junto con su intervalo de confianza al 95% entre paréntesis.

En la Figura 4.6 se refleja la diferencia del valor de IP en GIR entre el día 0 y el día 150 para cada antioxidante y el control. Al comparar el valor absoluto del incremento de IP ( $\Delta_{IP}$ ) que sufren las muestras de aceite a largo plazo, observamos primeramente que, todos los antioxidantes estudiados son capaces de reducir el incremento de IP respecto a la muestra control ( $\Delta_{IP}$  65,63). La diferencia con respecto al blanco es, en todos los casos, estadísticamente significativa ( $p < 1e-04$ ). Los compuestos con menor capacidad para retardar la formación de hidroperóxidos en GIR a largo plazo son TOC ( $\Delta_{IP}$  61,23), BHA ( $\Delta_{IP}$  58,88), GSE ( $\Delta_{IP}$  56,90) y OE ( $\Delta_{IP}$  55,14). A diferencia de los resultados obtenidos en la evolución de formación de hidroperóxidos durante las primeras semanas de almacenamiento, observamos que el TBHQ ( $\Delta_{IP}$  51,1) muestra menor capacidad para reducir la formación de estos compuestos a largo plazo. Del mismo modo, el BHT ( $\Delta_{IP}$  44,9), que no mostró actividad alguna a corto plazo, es capaz de reducir el incremento de IP en GIR en un 30%. El AP y cuatro de los extractos de romero son los compuestos que muestran mejores resultados, sobre todo, el extracto RE5 ( $\Delta_{IP}$  30,85) que, como ya hemos mencionado, tiene como componente activo mayoritario el diterpeno CA (función ácido carboxílico) y cuya adición en la concentración estudiada supone una reducción del 50% en el valor del IP del aceite de girasol a los 150 días. No encontramos explicación al peor resultado mostrado por el extracto RE4, respecto al resto de extractos de romero.

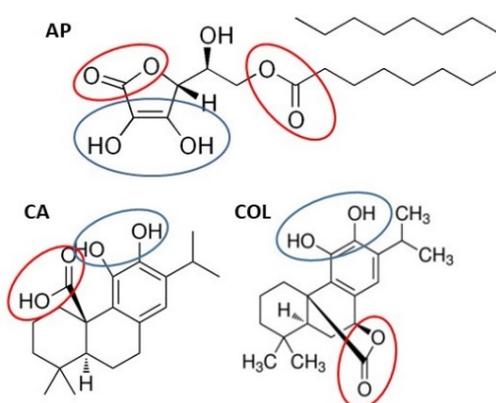
¿Por qué AP y CA/COL podrían ser los compuestos más activos en cuanto a su actividad antioxidante *vs* hidroperóxidos de ácidos grasos?

Es bien conocido que, para que un antioxidante sea realmente eficaz debe poseer dos características fundamentales: unas propiedades físicas similares a la matriz a la que se pretende proteger (lipídica en este caso) y una estructura molecular capaz de captar y estabilizar los radicales libres o especies responsables de la cascada oxidativa.

Tanto AP como CA y COL, que son dos compuestos de naturaleza lipídica, si observamos detalladamente, presentan dos grupos estructurales que no poseen simultáneamente el resto de los compuestos (ver Figura 4.7):

- La presencia de la estructura  $-O-[C=O]-$  (Estructura éster-ácido carboxílico)
- La presencia de un grupo catecol o estructura tipo orto-dihidroxi.

Ninguno de los compuestos antioxidantes de naturaleza lipídica estudiados presenta simultáneamente estos dos grupos funcionales específicos. Por otro lado, los dos extractos vegetales, además de los de romero, incluidos en este estudio, OE y GSE, sí presentan en su estructura molecular grupos catecol, pero carecen del necesario carácter lipofílico. GSE y OE son extractos de naturaleza hidrofílica, solubles en agua y en mezclas hidro-alcohólicas.



**Figura 4.7.** Descripción de características estructurales de: palmitato de ascorbilo (AP), ácido carnósico (CA) y carnosol (COL).

Por otro lado, con independencia de estos valores obtenidos y de la demostrada capacidad antioxidante *vs* hidroperóxidos de algunos de los compuestos estudiados, resulta evidente que, tanto el aceite control, como el que contiene cada antioxidante han seguido incrementando su valor de IP, es decir, se han seguido acumulando hidroperóxidos de forma progresiva, a pesar de que se pudieran haber generado especies con grupos carbonilo, lo que sugiere, inicialmente que, en estas condiciones de estudio, la velocidad de formación de hidroperóxidos es mayor que la de compuestos carbonílicos en GIR.

El estudio de la evolución del IA, en las mismas condiciones, nos va a permitir confirmar o modificar estas consideraciones preliminares.

#### Índice de *p*-anisidina

En todas las muestras estudiadas la evolución del IA en GIR a lo largo de los 35 días iniciales de estudio resulta aparentemente muy poco significativa.

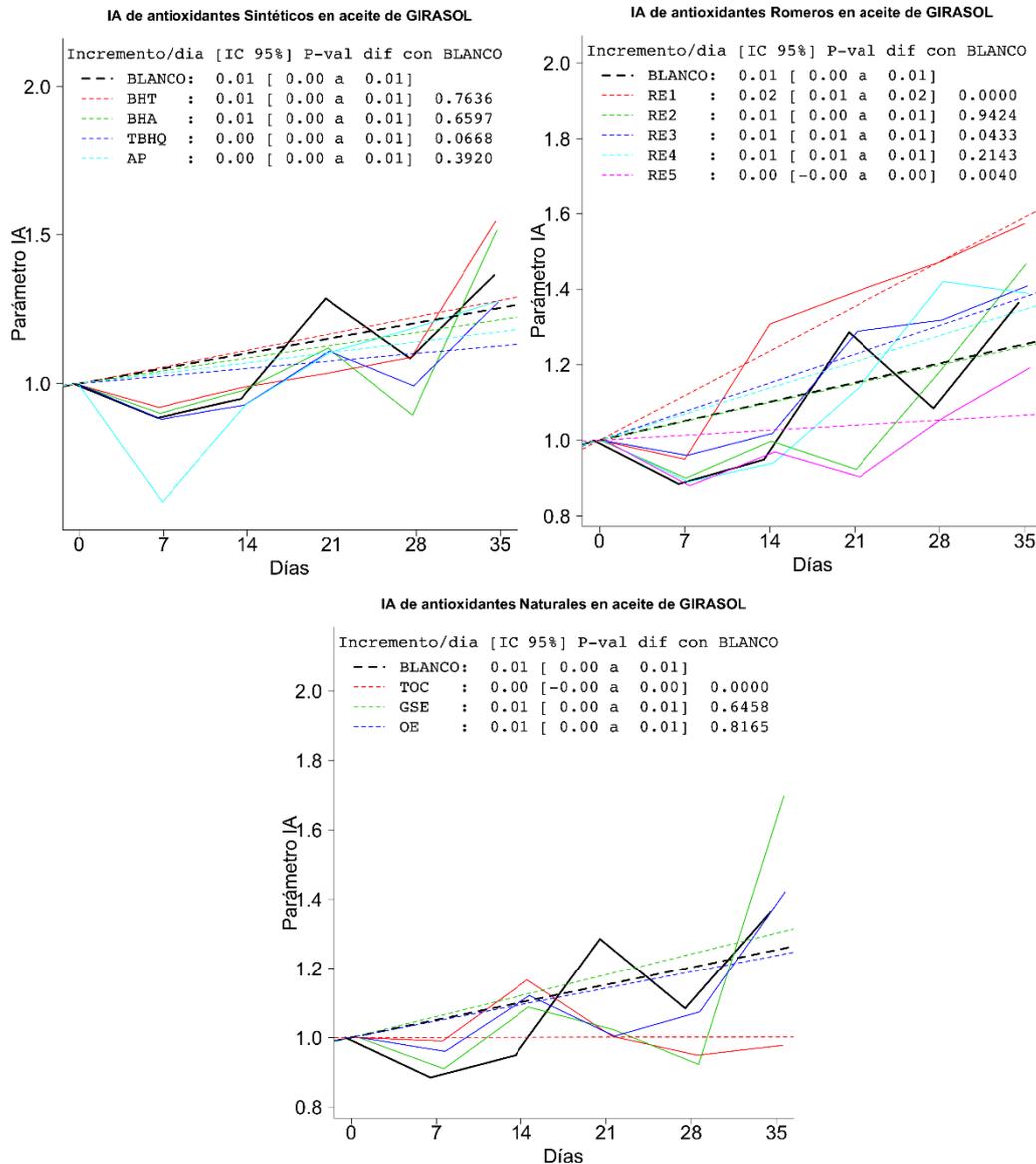
Dentro del grupo de antioxidantes sintéticos, los resultados obtenidos en la evolución de IA se reflejan en la Figura 4.8. Comparando el incremento del parámetro IA/día (es decir, la pendiente de la recta de regresión lineal) de la muestra control (0.01/día) con el incremento IA/día de las muestras con antioxidante, observamos que ninguno de los compuestos sintéticos presenta capacidad antioxidante en este ensayo, mostrando un perfil de IA idéntico al del aceite control sin antioxidantes (blanco).

Dentro de los grupos de extractos de romeros y de otros antioxidantes naturales (Figura 4.8) observamos un comportamiento muy similar al descrito para los antioxidantes sintéticos. Solamente el RE5 y TOC parecen retardar levemente la velocidad de formación de productos secundarios de oxidación respecto al blanco ( $p < 0,01$  y  $p < 1e-04$ , respectivamente).

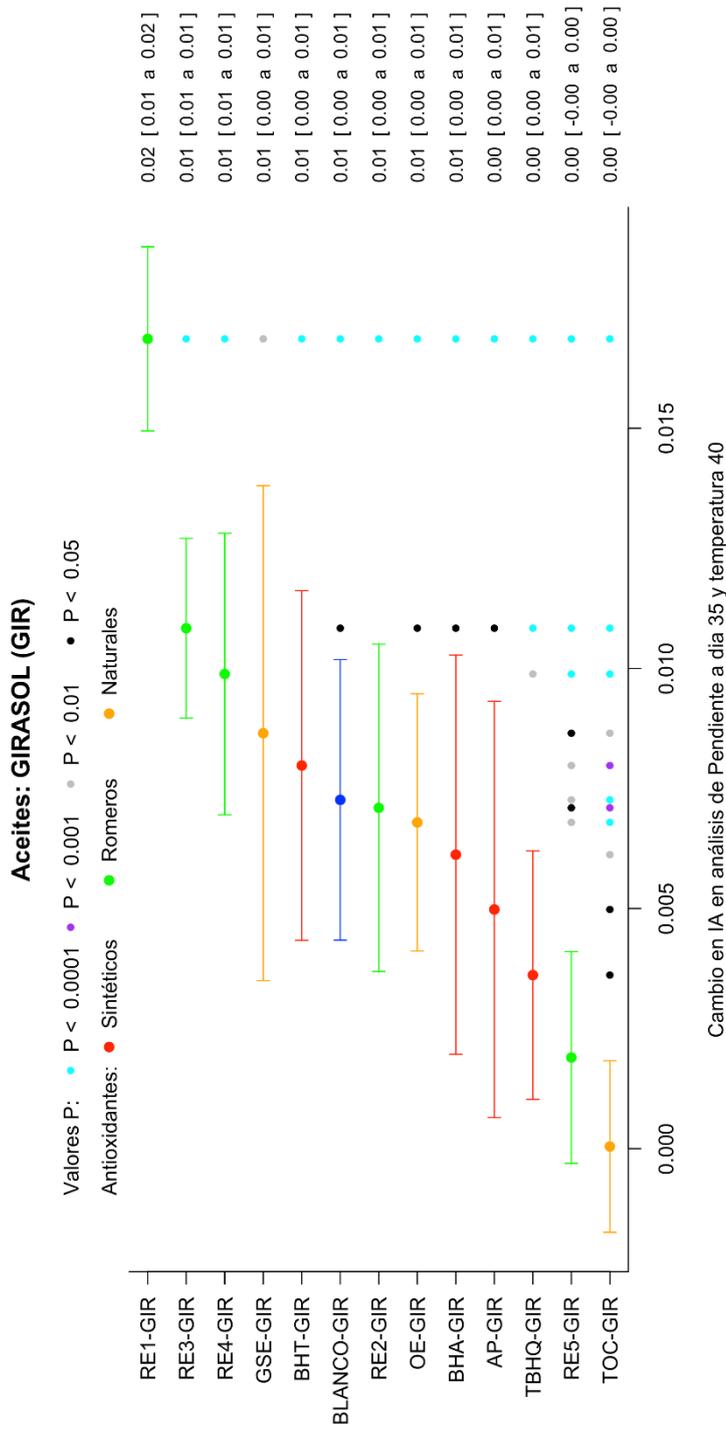
La Figura 4.9 muestra el análisis comparativo de las tendencias entre todos los antioxidantes y el blanco. Como ya hemos mencionado en el análisis de evolución del parámetro IA, las diferencias encontradas entre las distintas tendencias de evolución son mínimas y poco significativas.

En la Figura 4.10 se refleja la diferencia del valor de IA ( $\Delta_{IA}$ ) entre el día 0 y el día 150 para cada antioxidante. Se observa de nuevo que, en general, no hay diferencias significativas en el incremento de este parámetro transcurridos estos 5 meses de envejecimiento de las muestras. Solo podría mencionarse, que los compuestos que presentan una diferencia estadísticamente significativa de su valor de IA, en relación con el control ( $\Delta_{IA}$  1,75), serían AP ( $\Delta_{IA}$  0,61), BHT ( $\Delta_{IA}$  0,64), TOC ( $\Delta_{IA}$  0,70) y el extracto RE3 ( $\Delta_{IA}$  0,74), ( $p > 0,01$ ;  $p < 0,01$ ;  $p < 0,05$  y  $p < 0,05$ , respectivamente).

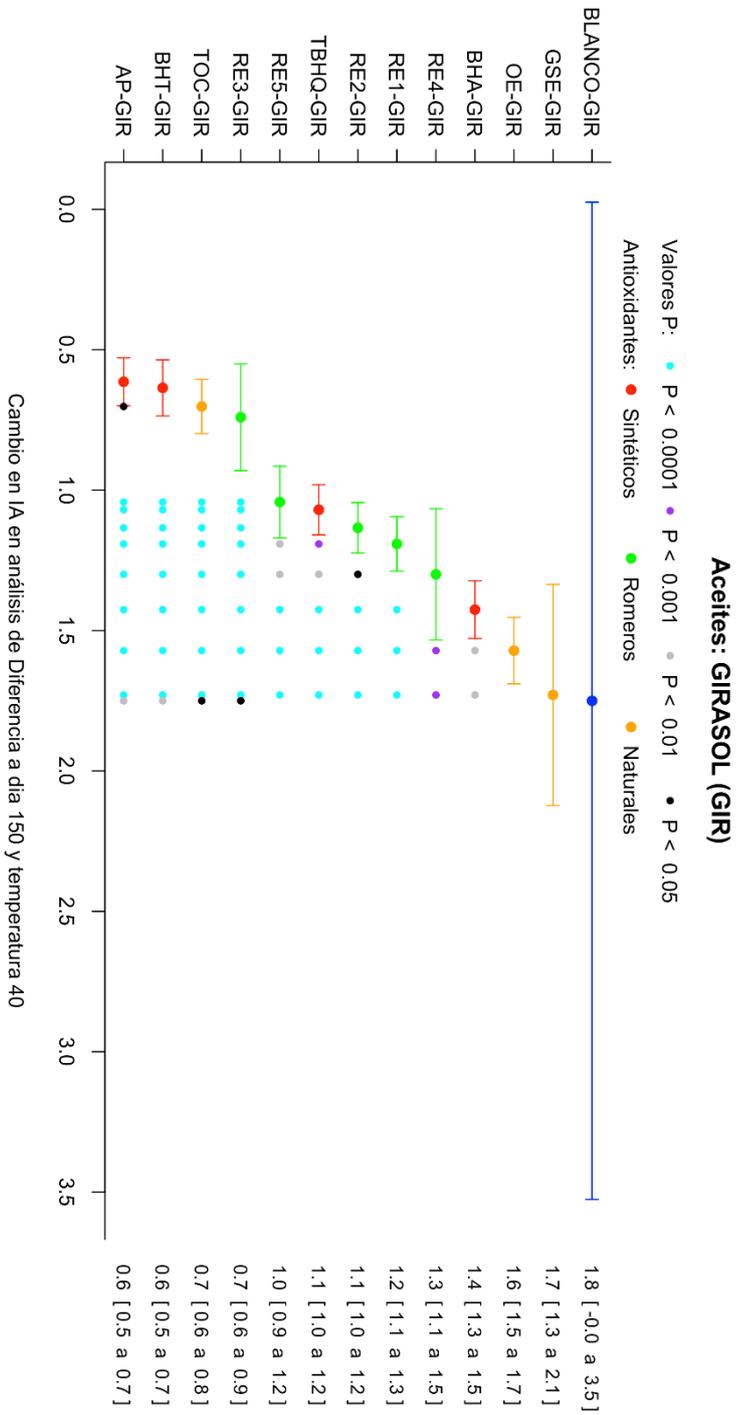
En estas condiciones no es posible establecer una explicación estructura molecular-actividad razonable y consistente. Dados los resultados en el aceite control y en los aceites con antioxidantes, podría argumentarse como teoría más plausible que las condiciones de oxidación no promueven la formación de compuestos con grupos carbonilo (aldehídos principalmente), ni otras reacciones secundarias de oxidación, a partir de los hidroperóxidos. Con objeto de estudiar el comportamiento de estos aceites en condiciones más drásticas de oxidación, se realizaron estudios a  $T^a$  60°C.



**Figura 4.8.** Evolución del parámetro IA a lo largo de 35 días y tendencia (estimada con regresión lineal) para cada antioxidante y el blanco en el aceite de girasol alto oleico envejecido a 40°C. En el eje de abscisas se representa el tiempo de envejecimiento (días) y en el de ordenadas se representa el parámetro IA. En la leyenda se refleja para cada antioxidante: la pendiente de la recta (incremento IA/día), su intervalo de confianza al 95% y el p-valor de la diferencia estadística de cada antioxidante respecto al blanco.



**Figura 4.9.** Gráfica comparativa del efecto de los distintos antioxidantes estudiados sobre la velocidad de evolución de parámetro IA (pendiente) en el aceite de girasol alto oleico envejecido a 40°C. En el eje de ordenadas se muestran los antioxidantes ordenados ascendentemente en función del tamaño de su pendiente. En el eje de abscisas se representa el efecto de cada antioxidante expresado como incremento de IA/día. A la derecha se describe el valor medio de la pendiente junto con su intervalo de confianza al 95%



**Figura 4.10.** Gráfica comparativa del efecto de los distintos antioxidantes estudiados sobre el incremento del parámetro IA entre tiempo 0 y 150 días en el aceite de girasol alto oleico envejecido a 40°C. En el eje de ordenadas se muestran los antioxidantes ordenados ascendientemente en función del incremento de IA. En el eje de abscisas se representa el incremento de IA para cada antioxidante. A la derecha se describe el valor medio del incremento de IA junto con su intervalo de confianza al 95% entre paréntesis.

## Valor Totox

Las conclusiones generales que pueden obtenerse en esta evaluación de la oxidación total mediante el valor Totox, son relativamente similares a las ya descritas para el IP, como resultado de la muy reducida modificación del valor del IA.

Dentro del grupo de antioxidantes sintéticos, los resultados obtenidos en la evolución de Totox se reflejan en la Figura 4.11. Comparando el incremento del valor Totox/día de la muestra control (0,5/día) respecto al de las muestras con antioxidantes, observamos que los compuestos BHT (0,55/día) y BHA (0,55/día), no presentan capacidad antioxidante en este ensayo. Los dos antioxidantes AP (0,22/día) y TBHQ (0,17/día) son los que muestran mejores resultados en cuanto a la capacidad de reducir el incremento/día de oxidación global de GIR en este primer periodo de envejecimiento a 40°C ( $p < 0,001$  para ambos antioxidantes).

Todos los extractos de romero muestran una reducción estadísticamente significativa sobre la velocidad de oxidación total respecto al blanco (Figura 4.11), siendo RE5 (0,15/día), RE3 (0,27/día) y RE2 (0,25/día) los que mayor capacidad manifiestan ( $p < 1e-04$  para los tres extractos), seguidos de RE4 (0,34/día) y RE1 (0,37/día) ( $p < 0,01$  para ambos extractos).

El único compuesto dentro del grupo de otros extractos naturales que reduce la velocidad de oxidación total respecto al blanco en GIR es TOC (0,36/día) ( $p < 0,01$ ). Los extractos vegetales GSE y OE presentan una velocidad de oxidación total idéntica a la muestra control (Figura 4.11).

En la Figura 4.12 podemos observar que el extracto RE5 (0,15/día), cuyo PAA mayoritario es CA (14,66%) es el que presenta mayor capacidad para retardar la velocidad de incremento de oxidación total (Totox) en esta primera etapa de envejecimiento del aceite de girasol a 40°C. Prácticamente la misma actividad manifiesta el TBHQ (0,17/día) y el AP (0,22/día).

Los otros cuatro RE y TOC son los siguientes compuestos que manifiestan mejor respuesta, siendo los dos extractos RE2 (0,25/día) y RE3 (0,27/día) los que consiguen una menor velocidad de incremento de Totox/día respecto a RE4 (0,34/día), TOC (0,36/día) y RE1 (0,37/día), ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,001$  y  $p < 0,01$  respectivamente).

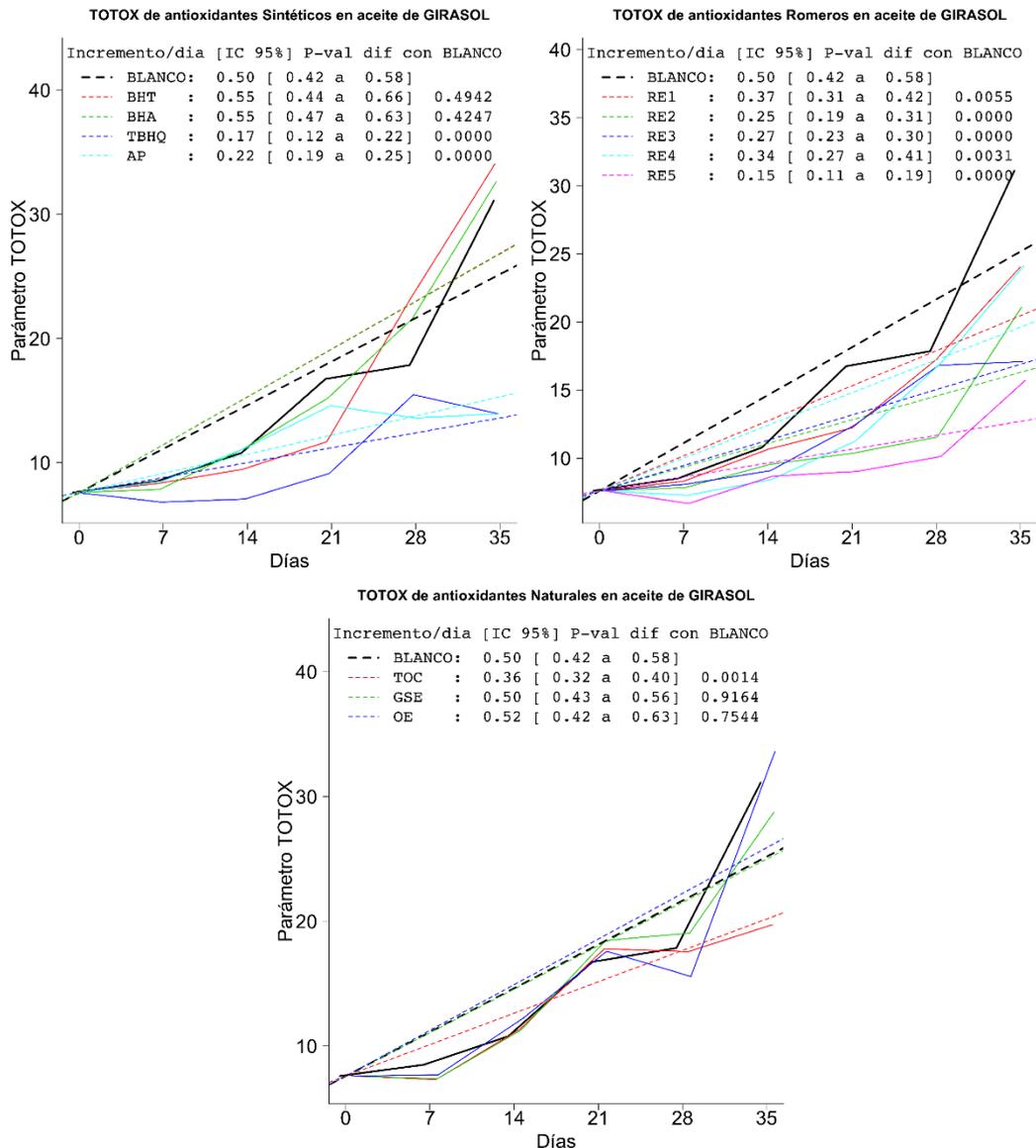
El resto de los antioxidantes, GSE, OE, BHA y BHT, no manifiestan efecto alguno sobre la velocidad de oxidación total en GIR, no mostrando diferencia estadísticamente significativa entre ellos.

El estudio de la evolución del valor Totox se extendió hasta los 5 meses (150 días) en las mismas condiciones de temperatura. A continuación, se describen los resultados obtenidos.

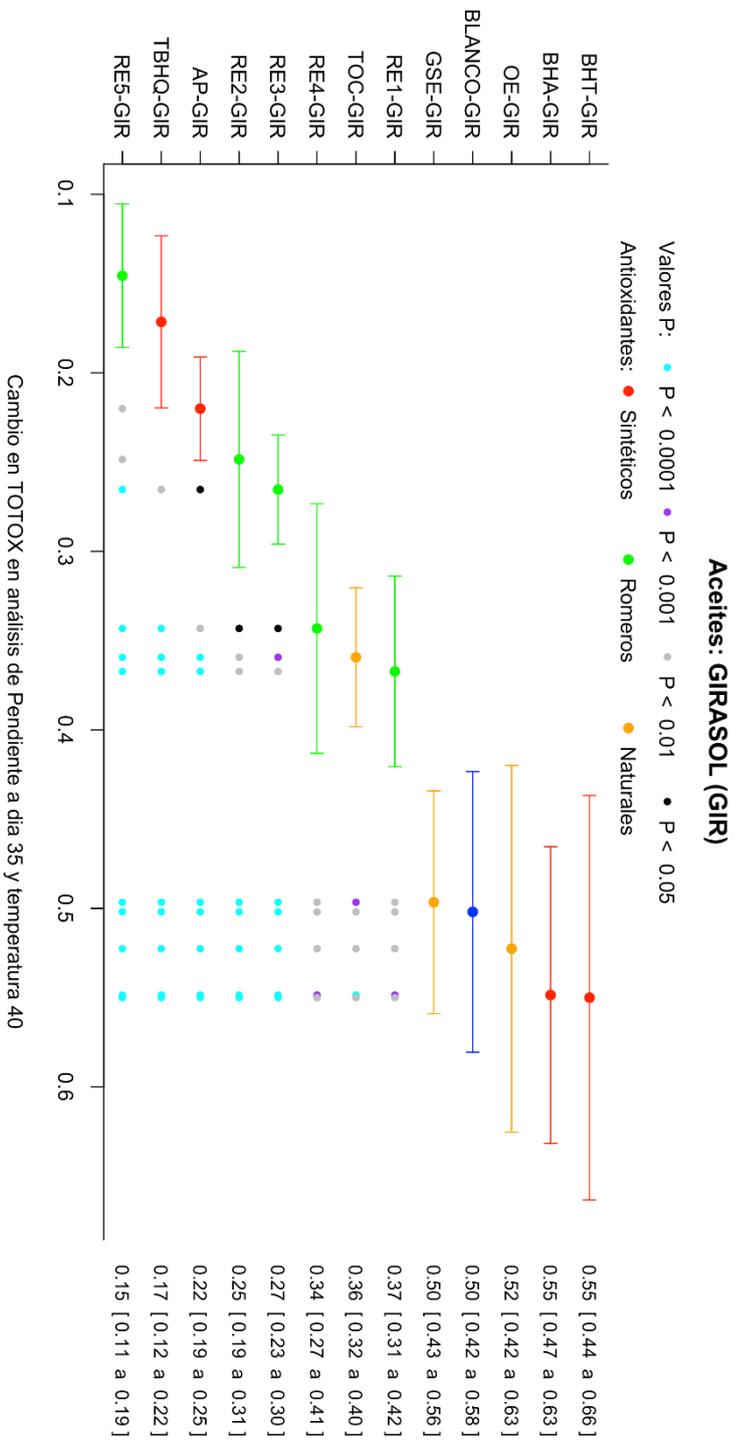
En la Figura 4.13 se refleja la diferencia del valor de Totox en GIR entre el día 0 y el día 150 para cada antioxidante y el control. Al comparar el valor absoluto del incremento de Totox ( $\Delta_{\text{TTX}}$ ) que sufren las muestras de aceite a largo plazo, observamos primeramente que, todos los antioxidantes estudiados son capaces de reducir el incremento de Totox respecto a la muestra control ( $\Delta_{\text{TTX}}133,0$ ) a los 150 días. La diferencia con respecto al blanco es, en todos los casos, estadísticamente significativa ( $p < 1e-04$ ). Los compuestos con menor capacidad para disminuir el incremento de Totox a largo plazo en GIR son TOC ( $\Delta_{\text{TTX}} 123,2$ ), BHA ( $\Delta_{\text{TTX}} 119,2$ ), GSE ( $\Delta_{\text{TTX}} 115,5$ ) y OE ( $\Delta_{\text{TTX}} 111,9$ ).

A diferencia de los resultados obtenidos en la evolución del valor de oxidación total durante las primeras semanas de almacenamiento, observamos que el TBHQ ( $\Delta_{\text{TTX}} 103,4$ ) muestra menor capacidad para reducir la oxidación total del aceite a largo plazo. Del mismo modo, el BHT ( $\Delta_{\text{TTX}} 90,4$ ), que no mostró actividad alguna a corto plazo, es capaz de reducir el incremento de IP en GIR en más de un 30%.

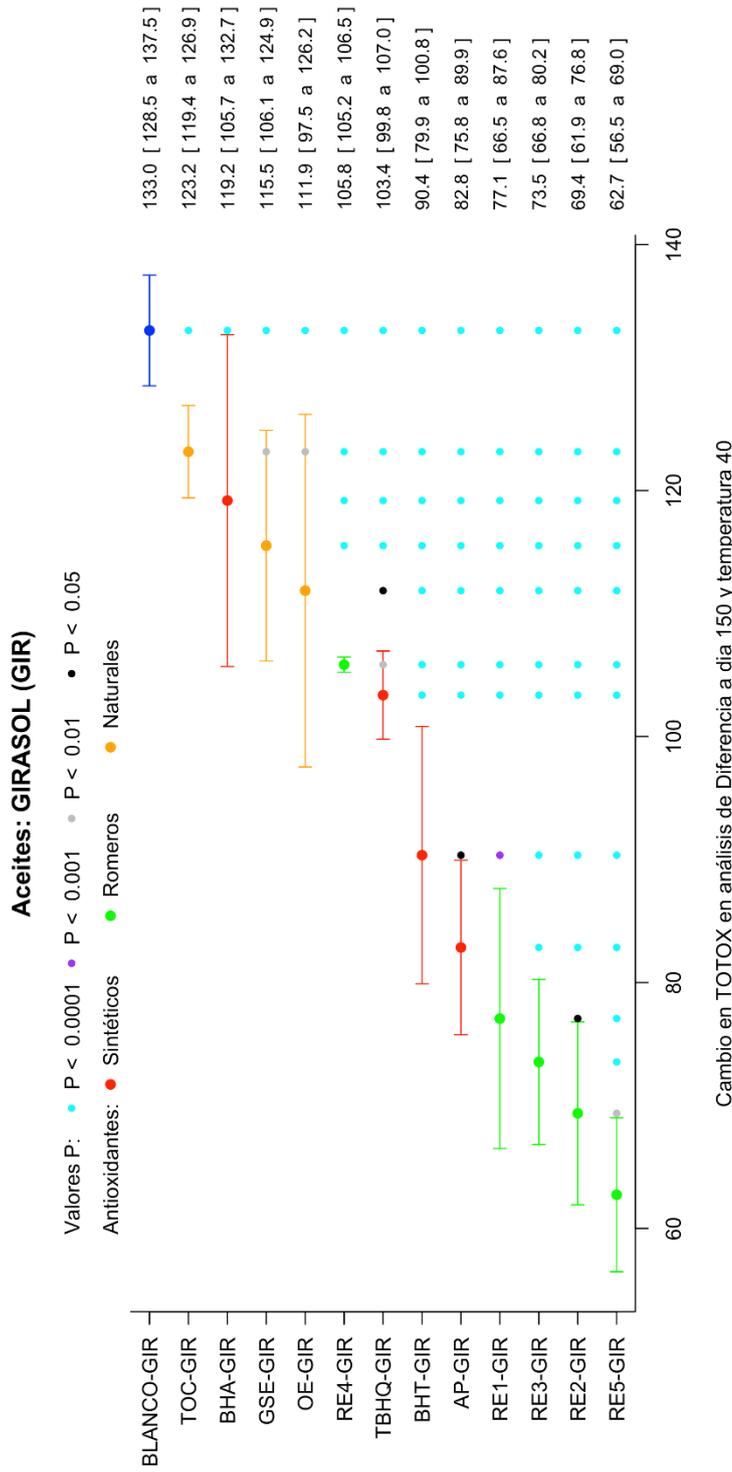
El AP y cuatro de los extractos de romero son los compuestos que muestran mejores resultados, sobre todo, el extracto RE5 ( $\Delta_{\text{TTX}} 62,7$ ) que, como ya hemos mencionado, tiene como componente activo mayoritario el diterpeno CA (función ácido carboxílico) y cuya adición en la concentración estudiada supone una reducción mayor al 50% en el incremento del valor Totox en el aceite de girasol a los 150 días. No encontramos explicación al peor resultado mostrado por el extracto RE4, respecto al resto de extractos de romero.



**Figura 4.11.** Evolución del valor Totox a lo largo de 35 días y tendencia (estimada con regresión lineal) para cada antioxidante y el blanco en el aceite de girasol alto oleico envejecido a 40°C. En el eje de abscisas se representa el tiempo de envejecimiento (días) y en el de ordenadas se representa el parámetro Totox. En la leyenda se refleja para cada antioxidante: la pendiente de la recta (incremento Totox/día), su intervalo de confianza al 95% y el p-valor de la diferencia estadística de cada antioxidante respecto al blanco.



**Figura 4.12.** Gráfica comparativa del efecto de los distintos antioxidantes estudiados sobre la velocidad de evolución de valor Totox (pendiente) en el aceite de girasol alto oleico envejecido a 40°C. En el eje de ordenadas se muestran los antioxidantes ordenados ascendentemente en función del tamaño de su pendiente. En el eje de abscisas se representa el efecto de cada antioxidante expresado como incremento de Totox/día. A la derecha se describe el valor medio de la pendiente junto con su intervalo de confianza al 95% entre paréntesis.



**Figura 4.13.** Gráfica comparativa del efecto de los distintos antioxidantes estudiados sobre el incremento del valor Totox entre tiempo 0 y 150 días en el aceite de girasol alto oleico envejecido a 40°C. En el eje de ordenadas se muestran los antioxidantes ordenados ascendentemente en función del incremento de Totox. En el eje de abscisas se representa el incremento de Totox para cada antioxidante. A la derecha se describe el valor medio del incremento de Totox junto con su intervalo de confianza al 95% entre paréntesis.

#### 4.3.1.2. Aceite de semilla de uva

##### Índice de peróxidos

En primer lugar, hemos de considerar que, a diferencia del caso anterior, aceite de girasol, en el que predominaba la presencia de ácido oleico (n-9), en este aceite de semilla de uva el ácido graso mayoritario es el ácido linoleico (n-6).

En las gráficas representadas (Figura 4.14) observamos que, en todas las muestras estudiadas la evolución del IP en SEM muestra una fase de latencia más o menos prolongada, que alcanza los 21 días en la muestra control, y hasta los casi 35 días en el caso de los sintéticos THBQ y AP, y para la mayoría de los RE. Esta fase de latencia del valor de IP, en general, desaparece al cabo de 21 días, iniciando un incremento progresivo con mayor o menor pendiente en cada uno de los compuestos estudiados.

Dentro del grupo de antioxidantes sintéticos, los resultados obtenidos en la evolución de IP se reflejan en la Figura 4.14. Comparando el incremento del parámetro IP/día (es decir, la pendiente de la recta de regresión lineal) de la muestra control (0,37/día) con el incremento IP/día de las muestras con antioxidantes, observamos que los compuestos BHT (0,36/día) y BHA (0,42/día), no presentan capacidad antioxidante en este ensayo, mostrando un perfil de evolución de IP idéntico al del aceite control sin antioxidantes (blanco). Sin embargo, los dos antioxidantes AP (0,16/día) y TBHQ (0,12/día) son los que muestran mejores resultados en cuanto a esta actividad, incluyendo un comportamiento muy similar en la evolución del valor de IP durante los 35 días, no solo en el valor del índice final. La capacidad de estos dos compuestos de reducir la velocidad de formación de hidroperóxidos respecto al blanco es estadísticamente muy significativa ( $p < 1e-04$  para ambos antioxidantes).

Dentro del grupo de los RE (Figura 4.14) observamos que todos ellos también reducen de manera muy significativa la velocidad de formación de hidroperóxidos respecto al blanco ( $p < 1e-04$  para los cinco extractos). Los extractos RE5 (0,14/día), RE2 (0,18/día) y RE3 (0,18/día) presentan mayor capacidad para reducir la velocidad de formación estos compuestos que los extractos RE4 (0,22/día) y RE1 (0,24/día).

Dentro del grupo de otros antioxidantes naturales (Figura 4.14) encontramos que los extractos TOC (0,39/día) y OE (0,37/día) no presentan capacidad para retardar la formación de productos primarios de oxidación, mostrando un perfil de IP idéntico al del aceite control sin antioxidantes (blanco). El extracto polifenólico GSE (0,18/día) muestra en su fase inicial un comportamiento también idéntico al del aceite control, pero el valor de IP muestra a partir de los 21 días un comportamiento distinto al resto de extractos dentro de este grupo, así como a la muestra control ( $p < 0,01$ ).

En la Figura 4.15 podemos observar que, al comparar el orden de eficacia para reducir la velocidad de evolución de IP de todos los antioxidantes en SEM, los resultados obtenidos son, en general, muy similares a los obtenidos para GIR.

Primeramente, observamos que, el extracto RE5 (0,14/día), cuyo PAA mayoritario es CA (14,66%), junto con antioxidantes sintéticos TBHQ (0,12/día) y AP (0,16/día) son los que presentan mayor capacidad para retardar la formación de hidroperóxidos en esta primera etapa de envejecimiento de SEM a 40°C ( $p < 1e-04$  para los tres compuestos *vs* control)

Los otros cuatro RE son los siguientes compuestos que manifiestan mejor respuesta, siendo la velocidad de formación de IP de los dos extractos RE3 (0,18/día) y RE2 (0,18/día) significativamente inferior a la de los dos extractos RE4 (0,22/día) y RE1 (0,24/día) ( $p < 1e-04$ ).

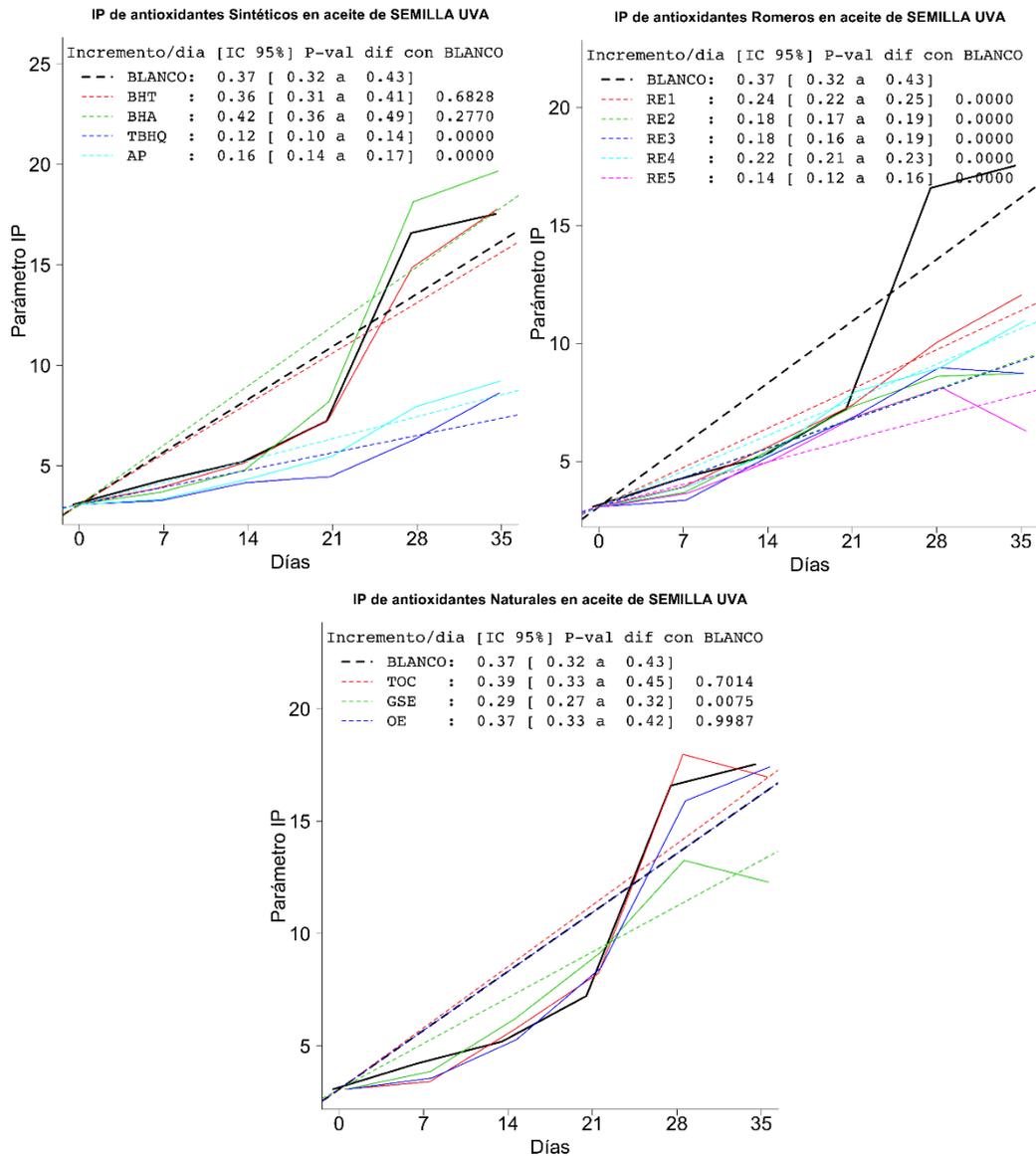
A continuación, a diferencia de lo que observamos en el estudio de evolución de IP en GIR, encontramos que GSE (0,29/día) sí presenta cierto efecto sobre la disminución de velocidad de formación de hidroperóxidos respecto al blanco ( $p < 0,01$ ). Sin embargo, a diferencia también de la evolución de IP observada en GIR, TOC (0,39/día) no manifiesta efecto, al igual que el resto de los antioxidantes, BHA, BHAT y OE, sobre la disminución de IP en SEM, no mostrando tampoco diferencia estadísticamente significativa entre ellos.

El estudio de la evolución del IP se extendió hasta los 5 meses (150 días) en las mismas condiciones de temperatura.

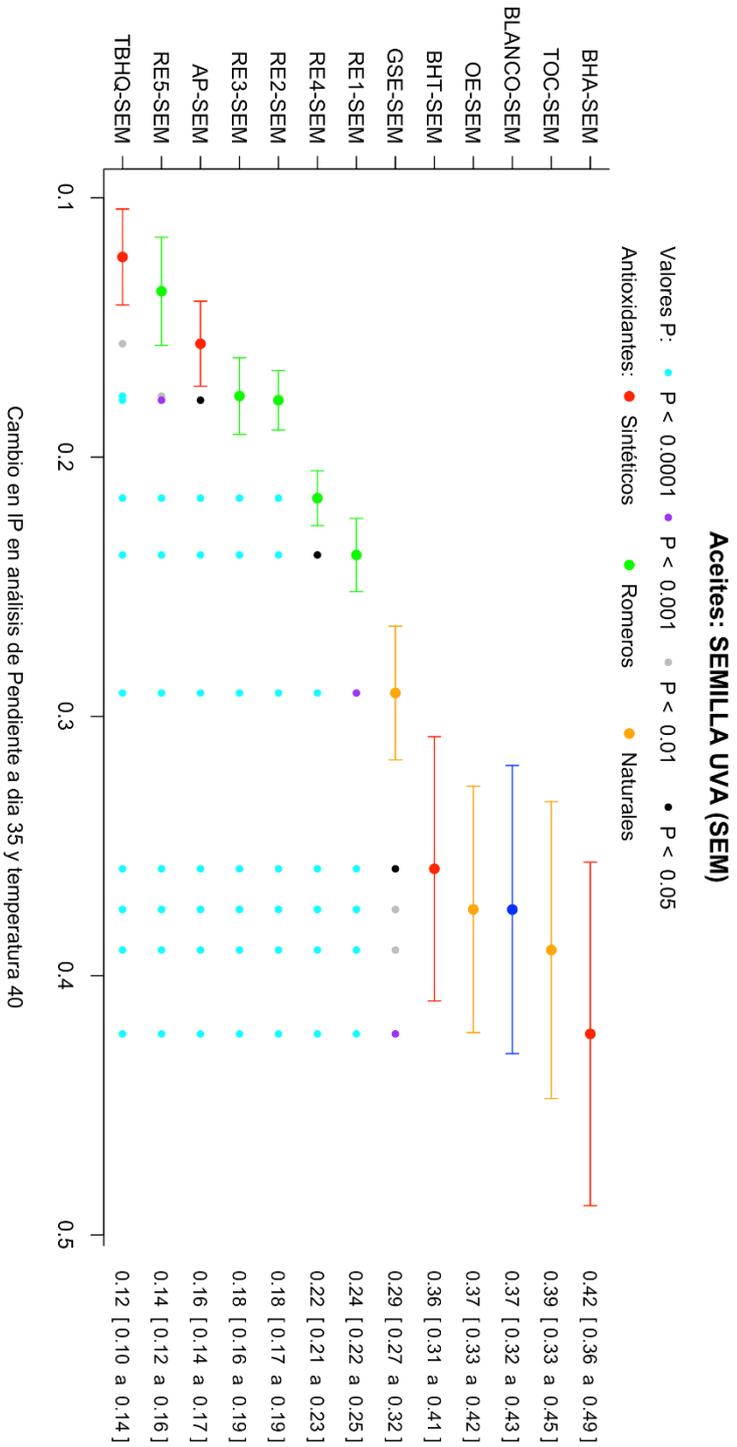
En la Figura 4.16 se refleja la diferencia del valor de IP ( $\Delta_{IP}$ ) en SEM entre el día 0 y el día 150 para cada antioxidante y el control. Al comparar el valor absoluto del incremento de IP que sufren las muestras de aceite a largo plazo, observamos

primeramente que, las conclusiones son relativamente diferentes a las obtenidas mediante la comparación de tendencia de IP durante los primeros 35 días.

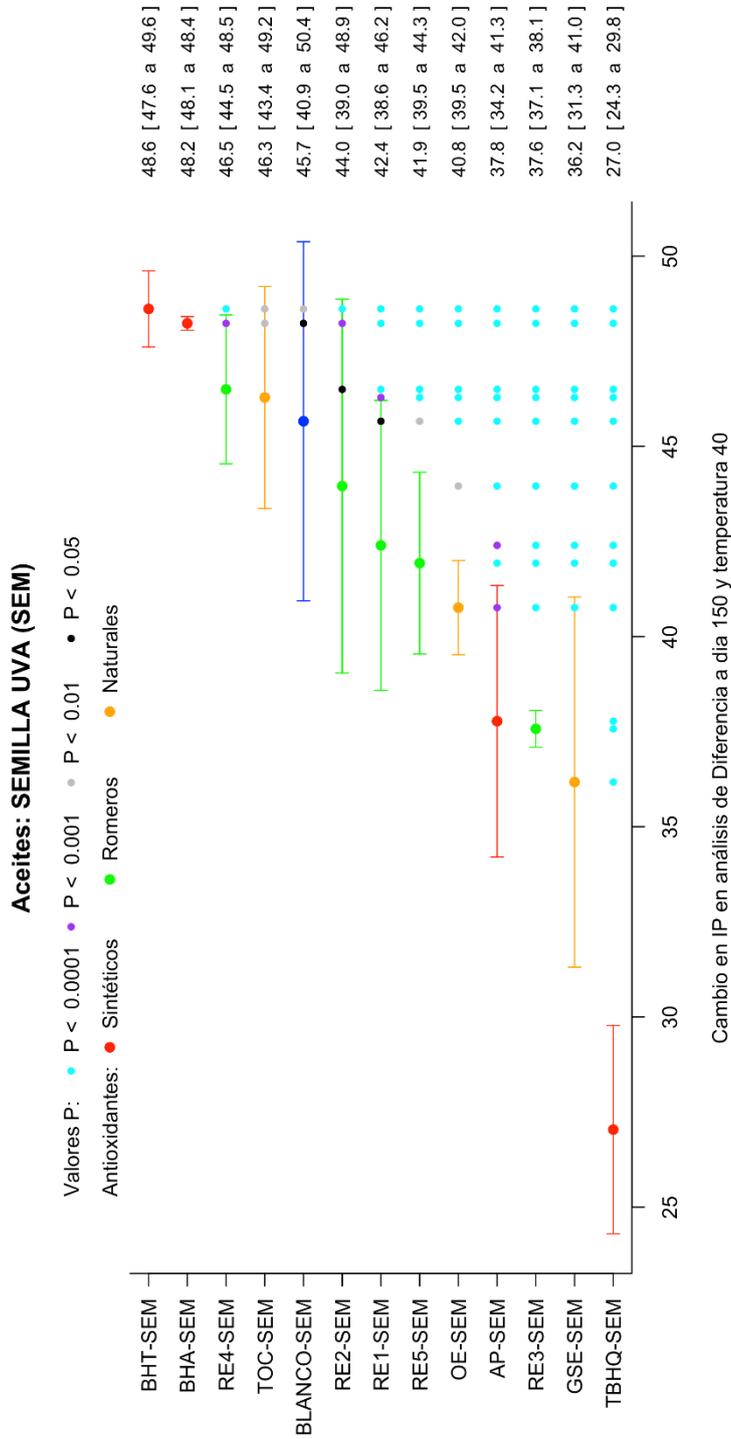
Por un lado, los antioxidantes BHT, BHA y TOC, siguen sin mostrar efecto protector frente a la formación de hidroperóxidos procedentes de ácidos grasos n-6 como el ácido linoleico a largo plazo. Los RE, en general, manifiestan una reducción en su capacidad para inhibir la formación de estos compuestos. Únicamente, uno de los extractos de romero, el RE3 ( $\Delta_{IP}$  37,6), junto con GSE ( $\Delta_{IP}$  36,2) y AP ( $\Delta_{IP}$  37,8), son capaces de mantener los niveles de IP un 20% inferiores a los del aceite control ( $\Delta_{IP}$  45,7) ( $p < 1e-04$  para los tres compuestos). El TBHQ ( $\Delta_{IP}$  27,0) es el que presenta mayor capacidad para reducir dicho valor, hasta un 40% del IP del aceite control ( $p < 1e-04$ ). El OE ( $\Delta_{IP}$  40,8), que no presentaba efecto alguno sobre la velocidad de formación de hidroperóxidos en la primera fase de estudio, sí es capaz a largo plazo de reducir en un 12% la formación de estos compuestos respecto al blanco ( $p < 1e-04$ ). Con estos datos no ha sido posible establecer de forma suficientemente sólida una relación estructura-actividad antioxidante *vs* hidroperóxidos de ácidos grasos n-6 en las condiciones del estudio.



**Figura 4.14.** Evolución del parámetro IP a lo largo de 35 días y tendencia (estimada con regresión lineal) para cada antioxidante y el blanco en el aceite de semilla de uva envejecido a 40°C. En el eje de abscisas se representa el tiempo de envejecimiento (días) y en el de ordenadas se representa IP (meq O<sub>2</sub>/Kg grasa). En la leyenda se refleja para cada antioxidante: la pendiente de la recta (incremento IP/día), su intervalo de confianza al 95% y el p-valor de la diferencia estadística de cada antioxidante respecto al blanco.



**Figura 4.15.** Gráfica comparativa del efecto de los distintos antioxidantes estudiados sobre la velocidad de evolución del parámetro IP (pendiente) en el aceite de semilla de uva envejecido a 40°C. En el eje de ordenadas se muestran los antioxidantes ordenados ascendientemente en función del tamaño de su pendiente. En el eje de abscisas se representa el efecto de cada antioxidante expresado como incremento de IP/día. A la derecha se describe el valor medio de la pendiente junto con su intervalo de confianza al 95%



**Figura 4.16.** Gráfica comparativa del efecto de los distintos antioxidantes estudiados sobre el incremento del parámetro IP entre tiempo 0 y 150 días en el aceite de semilla de uva envejecido a 40°C. En el eje de ordenadas se muestran los antioxidantes ordenados ascendentemente en función del incremento de IP. En el eje de abscisas se representa el incremento de IP para cada antioxidante. A la derecha se describe el valor medio del incremento de IP junto con su intervalo de confianza al 95% entre paréntesis.

Índice de *p*-anisidina

En todas las muestras estudiadas la evolución del IA en SEM a lo largo de los 35 días iniciales de estudio resulta prácticamente nula.

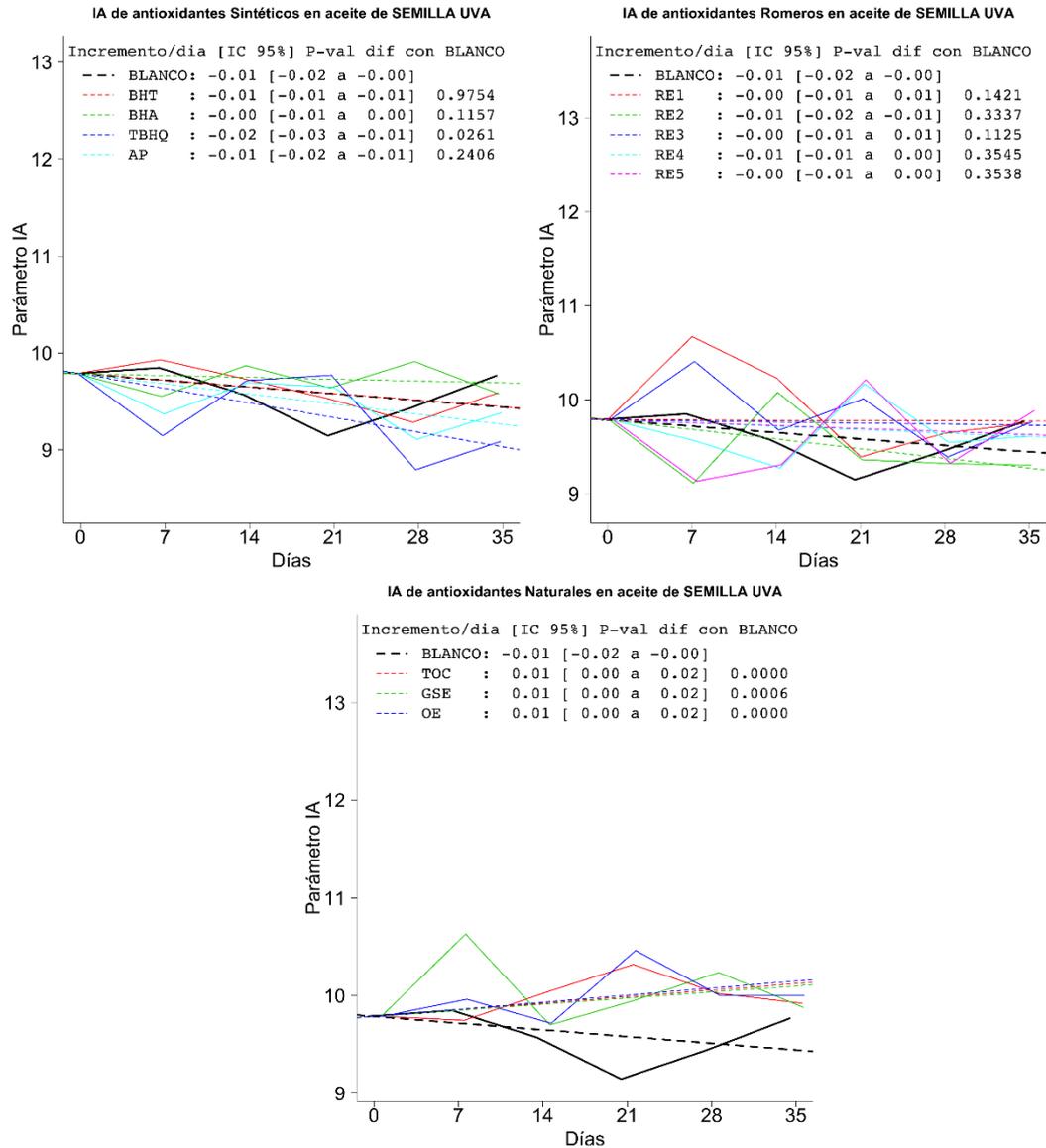
Los resultados obtenidos en la evolución de IA se reflejan en la Figura 4.17 para los tres grupos de antioxidantes. En ella observamos que, comparando el incremento del parámetro IA/día (es decir, la pendiente de la recta de regresión lineal) de la muestra control (-0.01/día) con el incremento IA/día de las muestras con antioxidante, ninguno de los compuestos presenta capacidad antioxidante en este ensayo, mostrando un perfil de IA idéntico al del aceite control sin antioxidantes (blanco). Solamente el TBHQ muestra una ligera disminución estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ )

En la Figura 4.18, que compara las tendencias de todos los antioxidantes entre ellos, tampoco podemos observar ningún efecto destacable en la reducción del valor de IA de las sustancias estudiadas.

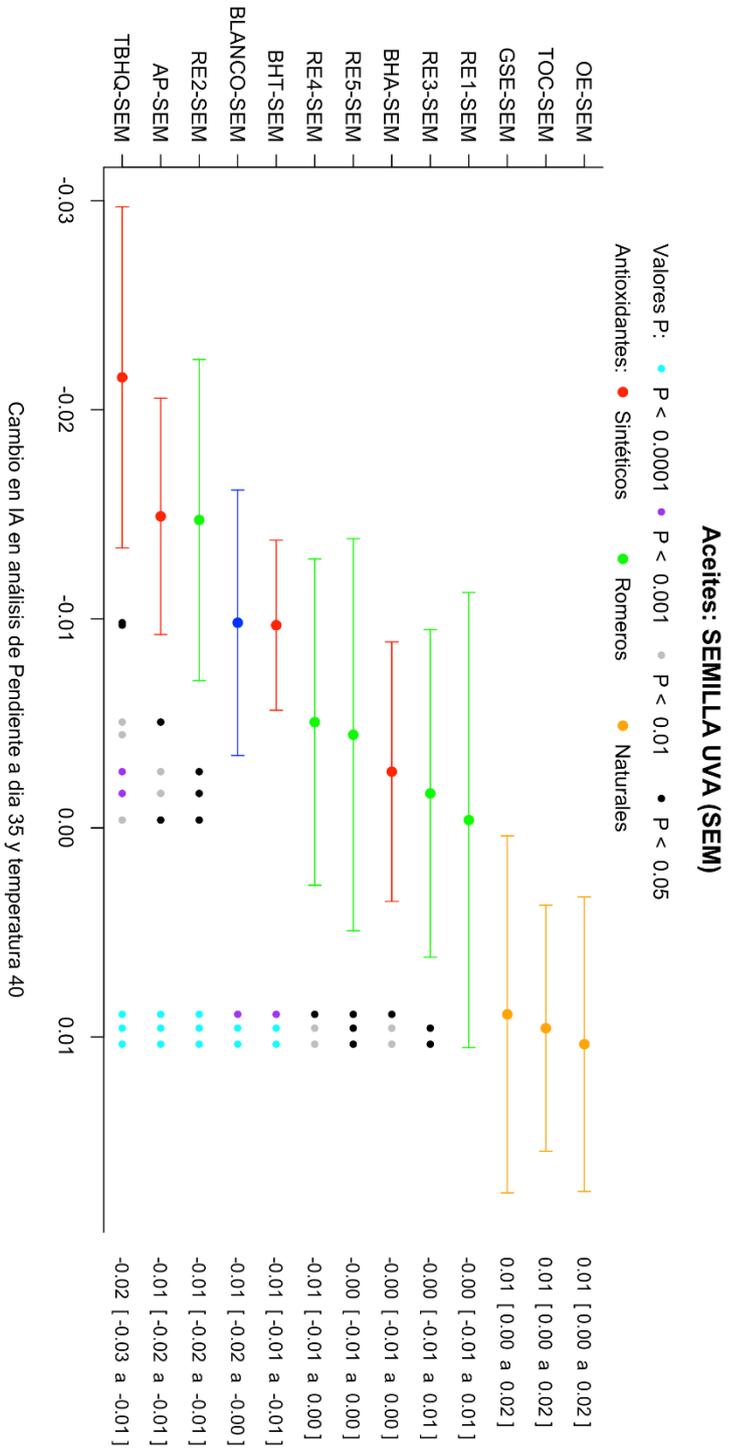
En la Figura 4.19 se refleja la diferencia del valor de IA ( $\Delta_{IA}$ ) entre el día 0 y el día 150 para cada antioxidante. Se observa que, en general, no hay diferencias significativas en el incremento de este parámetro transcurridos estos 5 meses de envejecimiento de las muestras. Solo podría mencionarse que, el TBHQ ( $\Delta_{IA} 0,4$ ) es el único compuesto que reduce significativamente el incremento de IA respecto al control ( $\Delta_{IA} 1,9$ ) ( $p < 1e-4$ ) y respecto al resto de antioxidantes ( $p < 1e-4$  y  $p < 0,001$ ).

En estas condiciones no es posible establecer una explicación estructura molecular-actividad razonable y consistente. Dados los resultados en el aceite control y en los aceites con antioxidantes, podría argumentarse como teoría más plausible que las condiciones de oxidación no facilitan/promueven la formación de compuestos con grupos carbonilo (aldehídos principalmente), ni otras reacciones secundarias de oxidación, a partir de los hidroperóxidos formados.

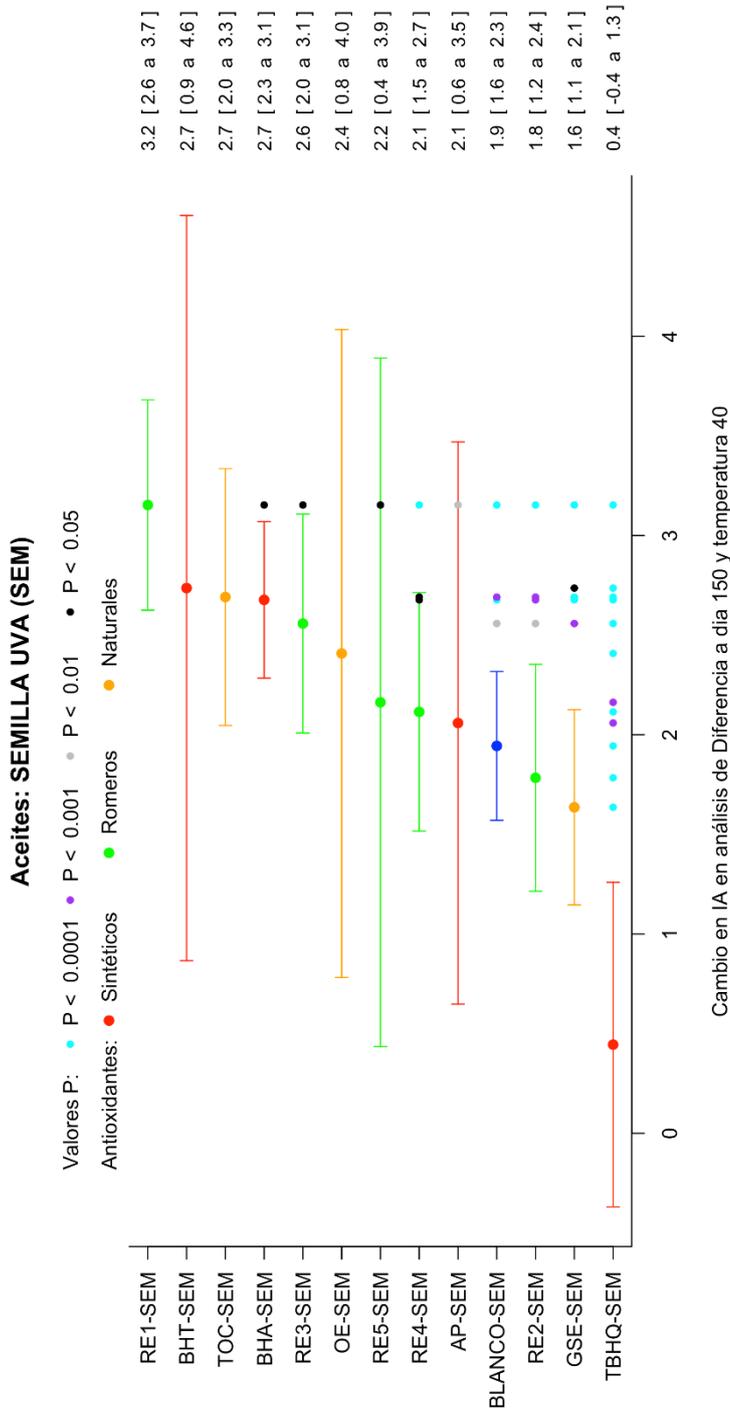
Con objeto de estudiar el comportamiento de estos aceites, sin y con la presencia de los antioxidantes, en condiciones más drásticas de oxidación, se realizaron estudios a  $T^a$  60°C. Estos estudios se describen en un capítulo posterior específico.



**Figura 4.17.** Evolución del parámetro IA a lo largo de 35 días y tendencia (estimada con regresión lineal) para cada antioxidante y el blanco en el aceite de semilla de uva envejecido a 40°C. En el eje de abscisas se representa el tiempo de envejecimiento (días) y en el de ordenadas se representa el parámetro IA. En la leyenda se refleja para cada antioxidante: la pendiente de la recta (incremento IA/día), su intervalo de confianza al 95% y el p-valor de la diferencia estadística de cada antioxidante respecto al blanco.



**Figura 4.18.** Gráfica comparativa del efecto de los distintos antioxidantes estudiados sobre la velocidad de evolución de parámetro IA (pendiente) en el aceite de semilla de uva envejecido a 40°C. En el eje de ordenadas se muestran los antioxidantes ordenados ascendientemente en función del tamaño de su pendiente. En el eje de abscisas se representa el efecto de cada antioxidante expresado como incremento de IA/día. A la derecha se describe el valor medio de la pendiente junto con su intervalo de confianza al 95% entre paréntesis.



**Figura 4.19.** Gráfica comparativa del efecto de los distintos antioxidantes estudiados sobre el incremento del parámetro IA entre tiempo 0 y 150 días en el aceite de semilla de uva envejecido a 40°C. En el eje de ordenadas se muestran los antioxidantes ordenados ascendentemente en función del incremento de IA. En el eje de abscisas se representa el incremento de IA para cada antioxidante. A la derecha se describe el valor medio del incremento de IA junto con su intervalo de confianza al 95% entre paréntesis.

## Valor Totox

Las conclusiones generales que pueden obtenerse en esta evaluación de la oxidación total mediante el valor Totox, son relativamente similares a las ya descritas para el IP, como resultado de la muy reducida modificación del valor del IA.

Dentro del grupo de antioxidantes sintéticos, los resultados obtenidos en la evolución de Totox se reflejan en la Figura 4.20. Comparando el incremento del valor Totox/día de la muestra control (0,74/día) respecto al de las muestras con antioxidantes, observamos que los compuestos BHT (0,71/día) y BHA (0,84/día), no presentan capacidad antioxidante en este ensayo. Los dos antioxidantes AP (0,30/día) y TBHQ (0,22/día) son los que muestran mejores resultados en cuanto a la capacidad de reducir el incremento/día de oxidación global de SEM en este primer periodo de envejecimiento a 40°C ( $p < 1e-04$  para ambos antioxidantes).

Todos los extractos de romero muestran una reducción estadísticamente significativa sobre la velocidad de oxidación total respecto al blanco (Figura 4.20), siendo RE5 (0,27/día), RE2 (0,34/día) y RE3 (0,35/día) los que mayor capacidad manifiestan, seguidos de RE4 (0,43/día) y RE1 (0,48/día) ( $p < 1e-04$  para los cinco extractos).

El único compuesto dentro del grupo de otros extractos naturales que reduce la velocidad de oxidación total respecto al blanco en SEM es GSE (0,59/día), aunque esta diferencia no es muy significativa ( $p < 0,05$ ). Los compuestos TOC (0,79/día) y OE (0,76/día) presentan una velocidad de oxidación total idéntica a la muestra control (Figura 4.20).

En la Figura 4.21 podemos observar de nuevo unos resultados similares a los obtenidos para el valor IP. De nuevo, TBHQ (0,22/día), el extracto RE5 (0,27/día) y AP (0,30/día) son las sustancias que presentan mayor capacidad para retardar el incremento de oxidación total (Totox) en esta primera etapa de envejecimiento del aceite de semilla de uva a 40°C ( $p < 1e-04$  para los tres compuestos *vs* control).

Los otros cuatro RE son los siguientes compuestos que manifiestan mejor respuesta, siendo los dos extractos RE2 (0,34/día) y RE3 (0,35/día) los que consiguen un menor incremento de Totox/día respecto a RE4 (0,43/día) y RE1 (0,48/día), ( $p < 1e-04$  para todo ellos).

A continuación, a diferencia de nuevo de lo que observamos en el estudio de la oxidación total en GIR, encontramos que GSE (0,59/día) sí presenta cierto efecto sobre la disminución de velocidad de formación de hidroperóxidos respecto al blanco ( $p < 0,05$ ).

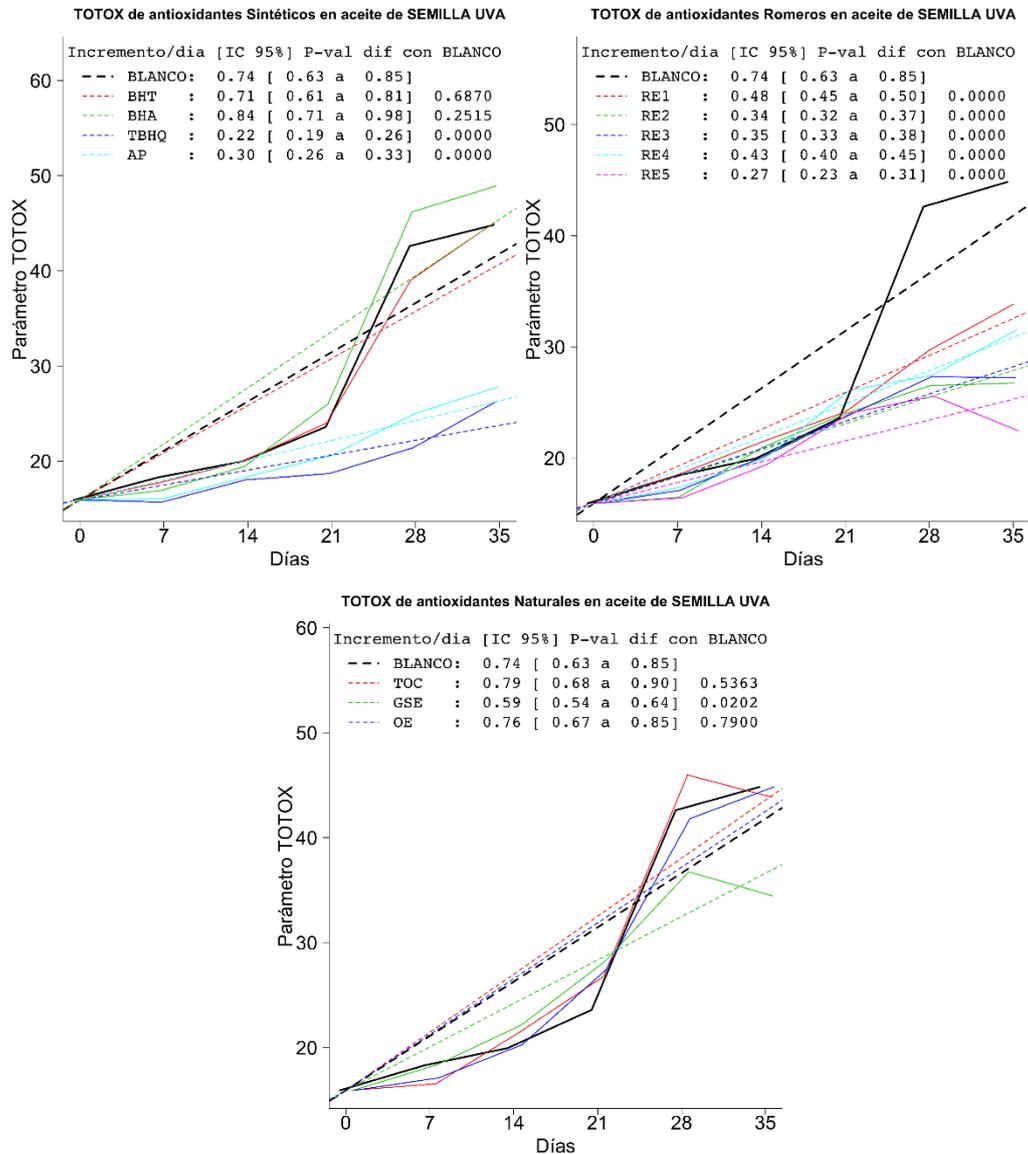
El resto de los antioxidantes, TOC, OE, BHA y BHT, no manifiestan efecto alguno sobre la disminución de Totox en SEM, no mostrando diferencia estadísticamente significativa entre ellos.

El estudio de la evolución del valor Totox se extendió hasta los 5 meses (150 días) en las mismas condiciones de temperatura.

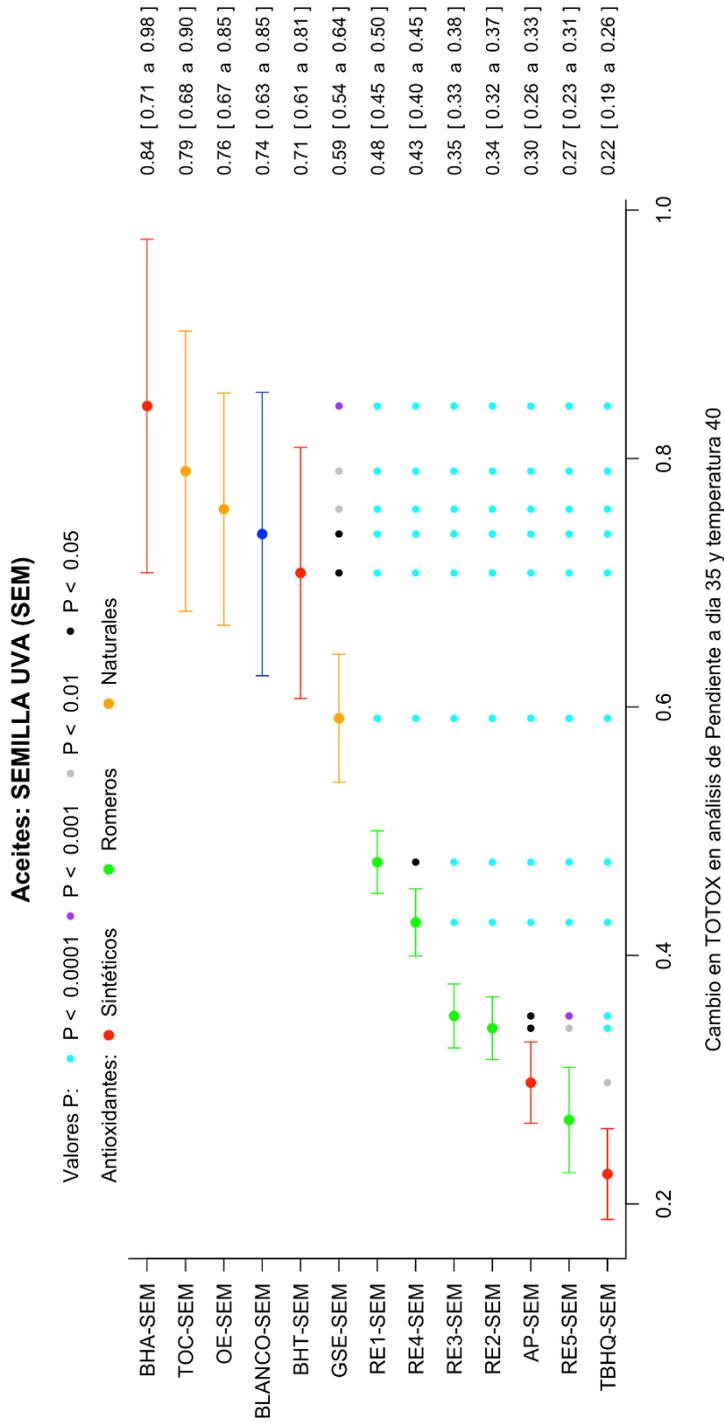
En la Figura 4.22 se refleja la diferencia del valor de Totox ( $\Delta_{\text{TTX}}$ ) en SEM entre el día 0 y el día 150 para cada antioxidante y el control. Al comparar el valor absoluto del incremento de Totox que sufren las muestras de aceite a largo plazo, observamos primeramente que, las conclusiones son relativamente diferentes a las obtenidas mediante la comparación de tendencia de Totox durante los primeros 35 días.

Por un lado, los antioxidantes BHT, BHA y TOC, siguen sin mostrar efecto protector frente a la oxidación lipídica de ácidos grasos n-6 como a largo plazo. Sin embargo, el OE ( $\Delta_{\text{TTX}}$  83,9), que no presentaba efecto alguno en la primera fase de estudio, sí es capaz a largo plazo de reducir en un 10% el valor Totox respecto al blanco ( $\Delta_{\text{TTX}}$  93,3) ( $p < 1e-04$ ). Los RE, en general, manifiestan una reducción en su capacidad para la oxidación total, presentando un valor de incremento de Totox muy similar al blanco. Únicamente, uno de los extractos de romero RE3 ( $\Delta_{\text{TTX}}$  77,7), junto al AP ( $\Delta_{\text{TTX}}$  77,6) presentan una reducción en el incremento de Totox de un 15% respecto al aceite control ( $p < 1e-04$  para los tres compuestos). El extracto vegetal GSE ( $\Delta_{\text{TTX}}$  74,0) es capaz de reducir el incremento de Totox hasta un 20%. TBHQ ( $\Delta_{\text{TTX}}$  54,5) es el que presenta mayor capacidad para reducir el incremento de Totox, hasta un 40% respecto al aceite control ( $p < 1e-04$ ).

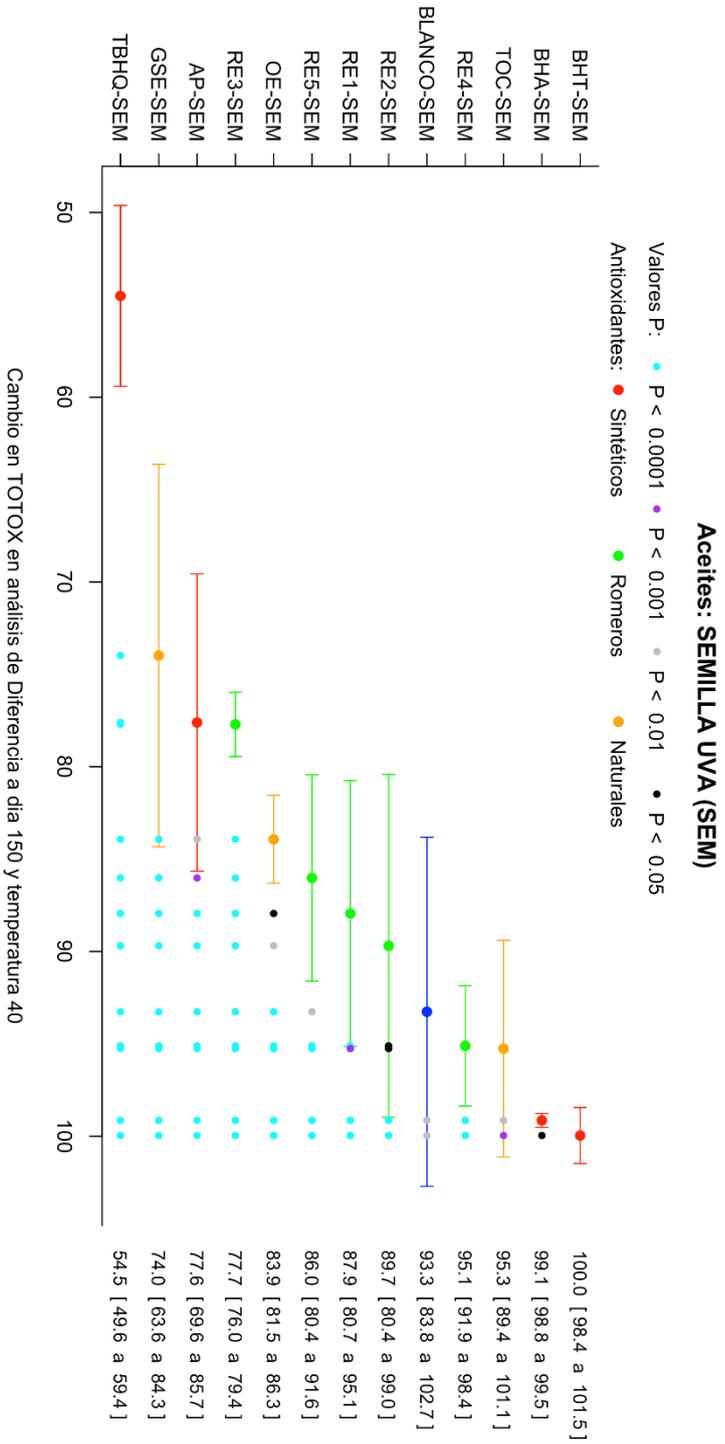
Con estos datos no ha sido posible establecer de forma suficientemente sólida una relación estructura-actividad antioxidante *vs* hidroperóxidos de ácidos grasos n-6 en las condiciones del estudio.



**Figura 4.20.** Evolución del valor Totox a lo largo de 35 días y tendencia (estimada con regresión lineal) para cada antioxidante y el blanco en el aceite de semilla de uva envejecido a 40°C. En el eje de abscisas se representa el tiempo de envejecimiento (días) y en el de ordenadas se representa el parámetro Totox. En la leyenda se refleja para cada antioxidante: la pendiente de la recta (incremento Totox/día), su intervalo de confianza al 95% y el p-valor de la diferencia estadística de cada antioxidante respecto al blanco.



**Figura 4.21.** Gráfica comparativa del efecto de los distintos antioxidantes estudiados sobre la velocidad de evolución de valor Totox (pendiente) en el aceite de semilla de uva envejecido a 40°C. En el eje de ordenadas se muestran los antioxidantes ordenados ascendentemente en función del tamaño de su pendiente. En el eje de abscisas se representa el efecto de cada antioxidante expresado como incremento de Totox/día. A la derecha se describe el valor medio de la pendiente junto con su intervalo de confianza al 95% entre



**Figura 4.22.** Gráfica comparativa del efecto de los distintos antioxidantes estudiados sobre el incremento del valor Totox entre tiempo 0 y 150 días en el aceite de semilla de uva envejecido a 40°C. En el eje de ordenadas se muestran los antioxidantes ordenados ascendientemente en función del incremento de Totox. En el eje de abscisas se representa el incremento de Totox para cada antioxidante. A la derecha se describe el valor medio del incremento de Totox junto con su intervalo de confianza al 95% entre paréntesis.

#### 4.3.1.3. Aceite de pescado

##### Índice de peróxidos

Al igual que en los aceites anteriores, a través de la evaluación del IP durante un primer periodo de 35 días (5 semanas) y un segundo periodo de hasta 5 meses (21 semanas) se ha intentado obtener ciertas conclusiones acerca de la actividad antioxidante primaria de los compuestos estudiados en la presente memoria, en definitiva, de su capacidad para bloquear o captar compuestos de tipo hidroperóxido generados en las primeras etapas oxidativas de estos aceites.

En primer lugar, hemos de considerar que, a diferencia de los casos anteriores, aceite de girasol alto oleico, en el que predominaba la presencia de ácido oleico (n-9) y aceite de semilla de uva, en el que predominaba la presencia de ácido linoleico (n-6), en este aceite de pescado el ácido graso mayoritario es el ácido docosahexaenoico (n-3).

En las gráficas descriptivas de los resultados de IP durante los primeros 35 días de envejecimiento a 40°C del aceite de pescado (Figura 4.23) observamos que, en todos los casos estudiados, se aprecia un incremento en el valor de IP durante la primera semana de estudio hasta los 7 días, seguido una tendencia oscilante de carácter sinusoidal que varía para los distintos antioxidantes. Este comportamiento puede ser debido a la alta inestabilidad del DHA (con 6 dobles enlaces en su estructura) mayoritariamente presente en el aceite de pescado de nuestro estudio. La muestra control (libre de antioxidantes) refleja claramente este comportamiento alternando subidas y bajadas en el valor de IP cada semana, lo que no permite apreciar una fase de latencia seguida de un incremento en la concentración de peróxidos como hemos apreciado en los aceites estudiados anteriormente en esta memoria.

Dentro del grupo de antioxidantes sintéticos, los resultados obtenidos en la evolución de IP se reflejan en la Figura 4.23. Comparando el incremento del parámetro IP/día (es decir, la pendiente de la recta de regresión lineal) de la muestra control (0,07/día) con el incremento IP/día de las muestras con antioxidantes, observamos que los compuestos BHT (-0,01/día) y BHA (0,03/día), son los únicos que presentan cierta capacidad de reducir la velocidad de formación

de hidroperóxidos respecto al blanco ( $p < 1e-04$  y  $p < 0,05$  respectivamente). Sin embargo, los antioxidantes TBHQ (0,07/día) y AP (0,06/día), que son los dos compuestos que mostraron mejor capacidad para frenar la formación de peróxidos dentro del grupo de los sintéticos para GIR y SEM, no manifiestan capacidad antioxidante en este aceite, mostrando una velocidad en el incremento del parámetro IP similar a la del aceite control sin antioxidantes (blanco).

Dentro del grupo de los RE (Figura 4.23) observamos que solo RE4 (-0,05/día) y RE5 (0,00/día) muestran una reducción en la velocidad de incremento de IP estadísticamente significativa respecto al blanco ( $p < 1e-04$  en ambos casos).

Dentro del grupo de otros antioxidantes naturales (Figura 4.23) encontramos que los extractos TOC (0,05/día) y OE (0,06/día) no presentan capacidad para retardar la formación de productos de oxidación primaria respecto al blanco. El extracto polifenólico GSE (0,10/día) muestra una aparente reducción en la tendencia de evolución del parámetro IP respecto al blanco ( $p < 1e-04$ ).

En la Figura 4.24 podemos observar que, al comparar el orden de eficacia para reducir la velocidad de evolución de IP de todos los antioxidantes en PES, los resultados obtenidos son muy variables y, en general, muy distintos a los obtenidos para GIR y SEM. Primeramente, observamos que, el extracto RE4 (-0,05/día), que es uno de los extractos de romero que menos actividad manifestó para inhibir la formación de compuestos de oxidación primaria en GIR y SEM es, en este caso, el que mejor comportamiento presenta de todos los antioxidantes estudiados, mostrando diferencias estadísticamente significativas con todo ellos. Del mismo modo, el antioxidante sintético BHT (-0,01/día), que tampoco mostró actividad en la reducción de IP durante la primera etapa de oxidación en los aceites anteriores, muestra mejores resultados sobre PES. RE5 (-0,00/día) y GSE (0,00/día) parecen mostrar también mejor comportamiento en cuanto a su capacidad para reducir el incremento de IP que las demás sustancias. EL resto de los antioxidantes estudiados: BHA, RE3, TOC, RE1, AP, OE, RE2 y TBHQ, no muestran diferencias significativas entre sus efectos.

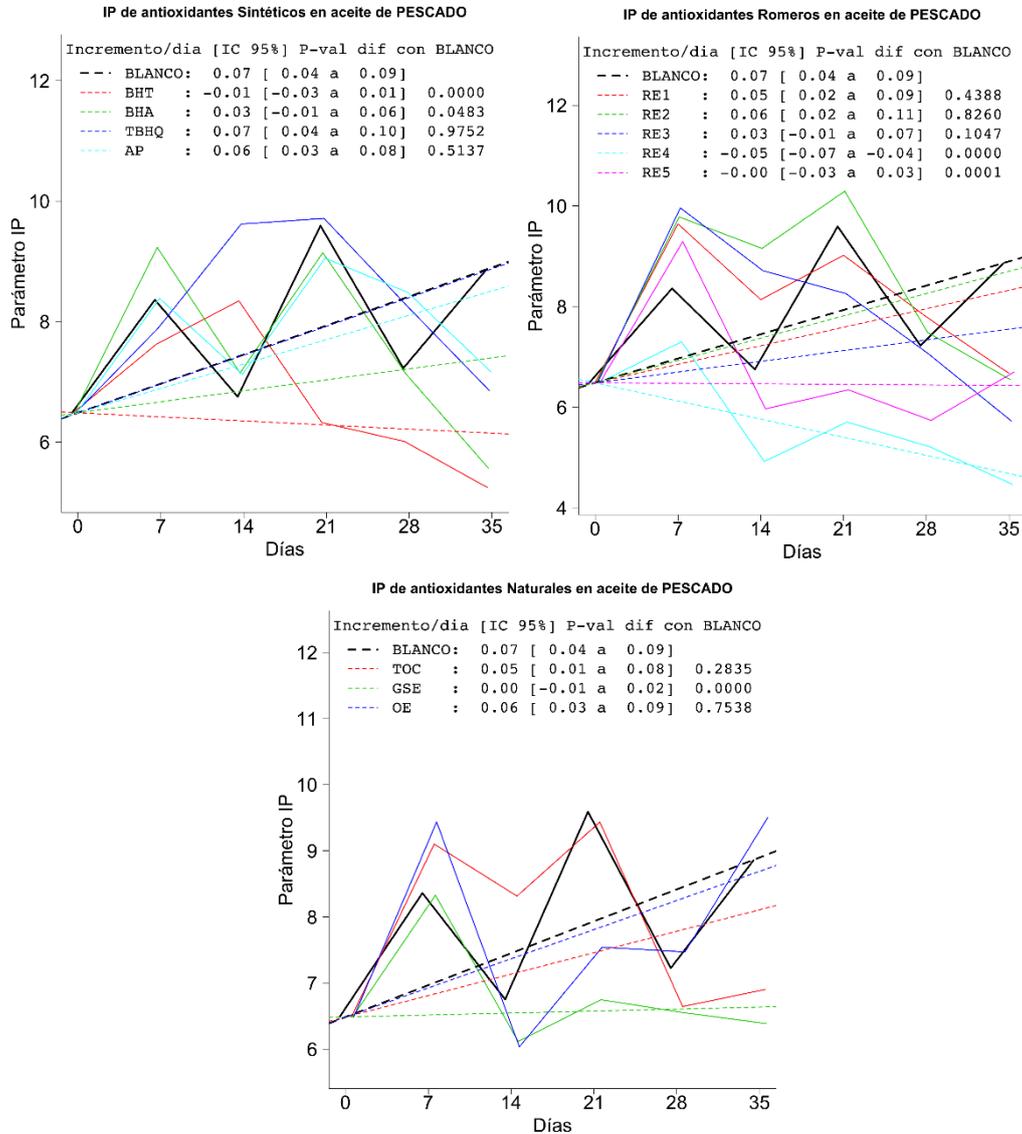
Es importante mencionar que el método empleado para analizar estadísticamente los resultados de evolución de IP obtenidos en los primeros 35 días de envejecimiento acelerado a 40°C ha sido el mismo para los tres aceites, el

análisis de pendientes. El objetivo en este análisis fue evaluar las diferencias de las tendencias de los distintos antioxidantes entre ellos y respecto al blanco. En el aceite de pescado encontramos que, al haber mucha variabilidad en la evolución de los valores de IP, las tendencias se estiman con más incertidumbre, por lo que es más difícil encontrar diferencias realmente significativas entre ellas.

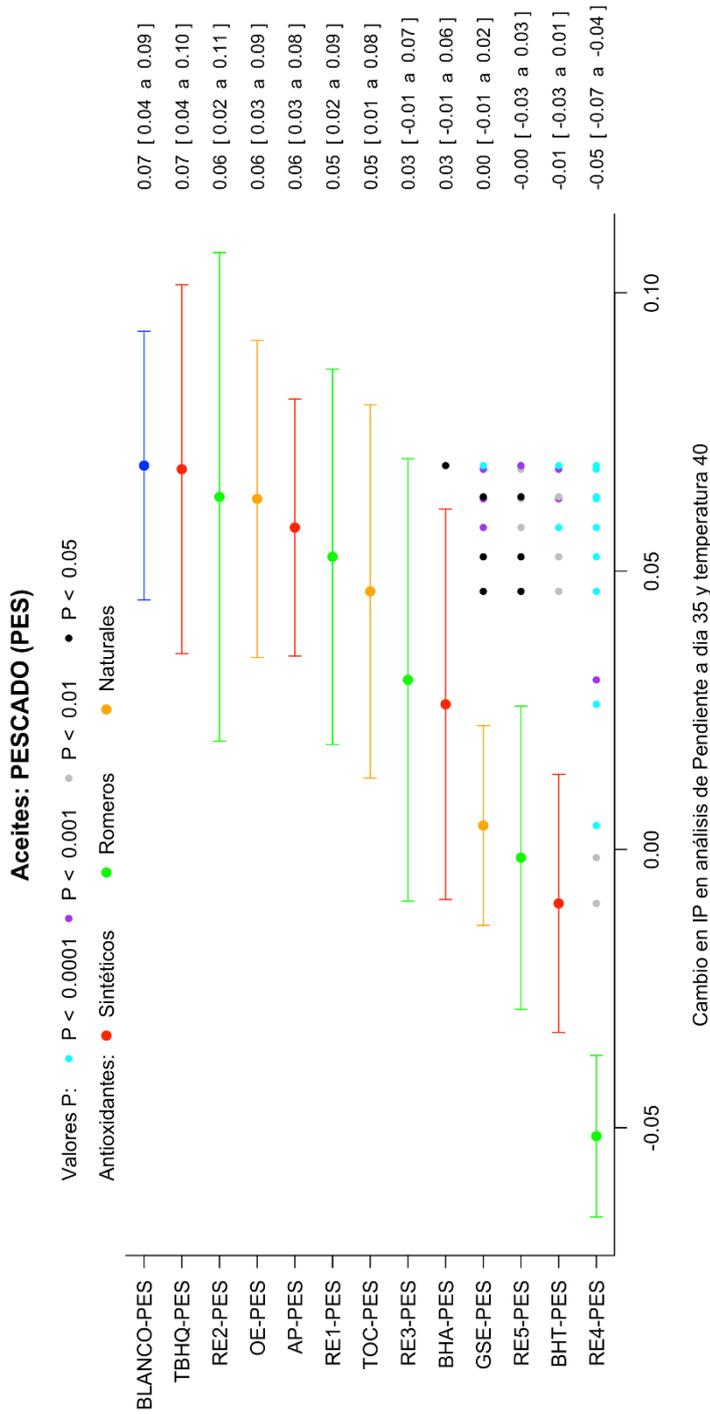
Al igual que para los dos aceites anteriormente estudiados, el estudio de la evolución del IP se extendió hasta los 5 meses (150 días) en las mismas condiciones de temperatura. En la Figura 4.25 se refleja la diferencia del valor de IP ( $\Delta_{IP}$ ) en aceite de pescado entre el día 0 y el día 150 para cada antioxidante y el control. Al comparar el valor absoluto del incremento de IP que sufren las distintas muestras de aceite a largo plazo, observamos que obtenemos valores negativos en todos los casos. Esto es debido a que, a lo largo del tiempo, el valor del parámetro IP descende notablemente en el aceite de pescado.

Este tipo de comportamiento ha sido descrito antes ya que, al considerar las reacciones de autooxidación lipídica en su conjunto y la forma en que los productos de estas reacciones se relacionan con el IP y el IA, es obvio que, en las primeras etapas de la autooxidación el IP aumentará, pero a medida que los peróxidos se descomponen en aldehídos y cetonas, el IA puede verse aumentado y, eventualmente, el IP comenzará a disminuir de nuevo (Talbot, 2016). También se ha descrito que, la composición de ácidos grasos es particularmente importante en relación con la estabilidad oxidativa de las grasas ya que, cuanto más insaturada sea una grasa, más rápida será la reacción de oxidación (de Camargo *et al.*, 2016; Liu & White, 1992). El hecho de que el aceite de pescado sometido a estudio fuese particularmente rico en ácidos grasos poliinsaturados, especialmente en DHA (83,3%), que contiene seis dobles enlaces en su molécula, puede justificar este comportamiento que refleja un grado de oxidación muy elevada en las condiciones de temperatura y tiempo estudiadas.

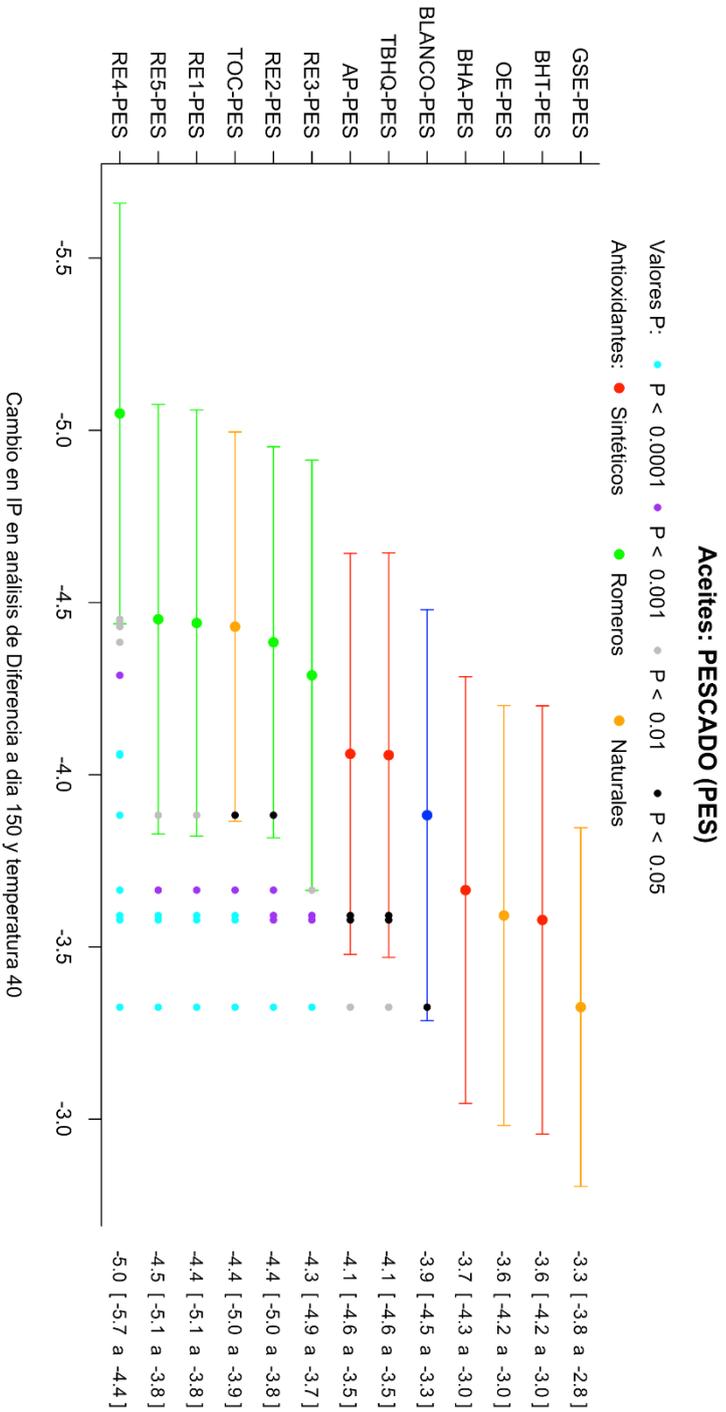
Con los datos obtenidos para el parámetro IP, no ha sido posible establecer de forma suficientemente sólida una relación estructura-actividad antioxidante *vs* hidroperóxidos de ácidos grasos omega-3 en las condiciones del estudio. El estudio de la evolución del IA, en las mismas condiciones, nos va a permitir confirmar o modificar estas consideraciones preliminares.



**Figura 4.23.** Evolución del parámetro IP a lo largo de 35 días y tendencia (estimada con regresión lineal) para cada antioxidante y el blanco en el pescado envejecido a 40°C. En el eje de abscisas se representa el tiempo de envejecimiento (días) y en el de ordenadas se representa IP (meq O<sub>2</sub>/Kg grasa). En la leyenda se refleja para cada antioxidante: la pendiente de la recta (incremento IP/día), su intervalo de confianza al 95% y el p-valor de la diferencia estadística de cada antioxidante respecto al blanco.



**Figura 4.24.** Gráfica comparativa del efecto de los distintos antioxidantes estudiados sobre la velocidad de evolución del parámetro IP (pendiente) en el pescado envejecido a 40°C. En el eje de ordenadas se muestran los antioxidantes ordenados ascendentemente en función del tamaño de su pendiente. En el eje de abscisas se representa el efecto de cada antioxidante expresado como incremento de IP / día. A la derecha se describe el valor medio de la pendiente junto con su intervalo de confianza al 95% entre paréntesis.



**Figura 4.25.** Gráfica comparativa del efecto de los distintos antioxidantes estudiados sobre el incremento del parámetro IP entre tiempo 0 y 150 días en el aceite de pescado envejecido a 40°C. En el eje de ordenadas se muestran los antioxidantes ordenados ascendientemente en función del incremento de IP. En el eje de abscisas se representa el incremento de IP para cada antioxidante. A la derecha se describe el valor medio del incremento de IP junto con su intervalo de confianza al 95% entre paréntesis.

Índice de *p*-anisidina

En las gráficas descriptivas de la evolución de los resultados de IA del aceite de pescado (Figura 4.26) se observa de nuevo que el aceite control sin antioxidante presenta, al igual que en el caso de la evolución del valor de IP, una tendencia oscilante de carácter sinusoidal alternando subidas y bajadas alternativas cada semana de análisis. Observamos que en las muestras en las que se ha aplicado algún antioxidante, esta oscilación en los valores de IA es menos marcada. Se aprecia una subida más pronunciada durante la primera semana de estudio, después de los 7 días el incremento en el valor IA respecto al tiempo presenta una tendencia más lineal.

Al analizar la comparativa de tendencias de los aceites con antioxidante añadido respecto al control (Figura 4.26) observamos que, en los tres grupos de antioxidantes estudiados, ninguno de ellos muestra diferencia estadísticamente significativa en su tendencia.

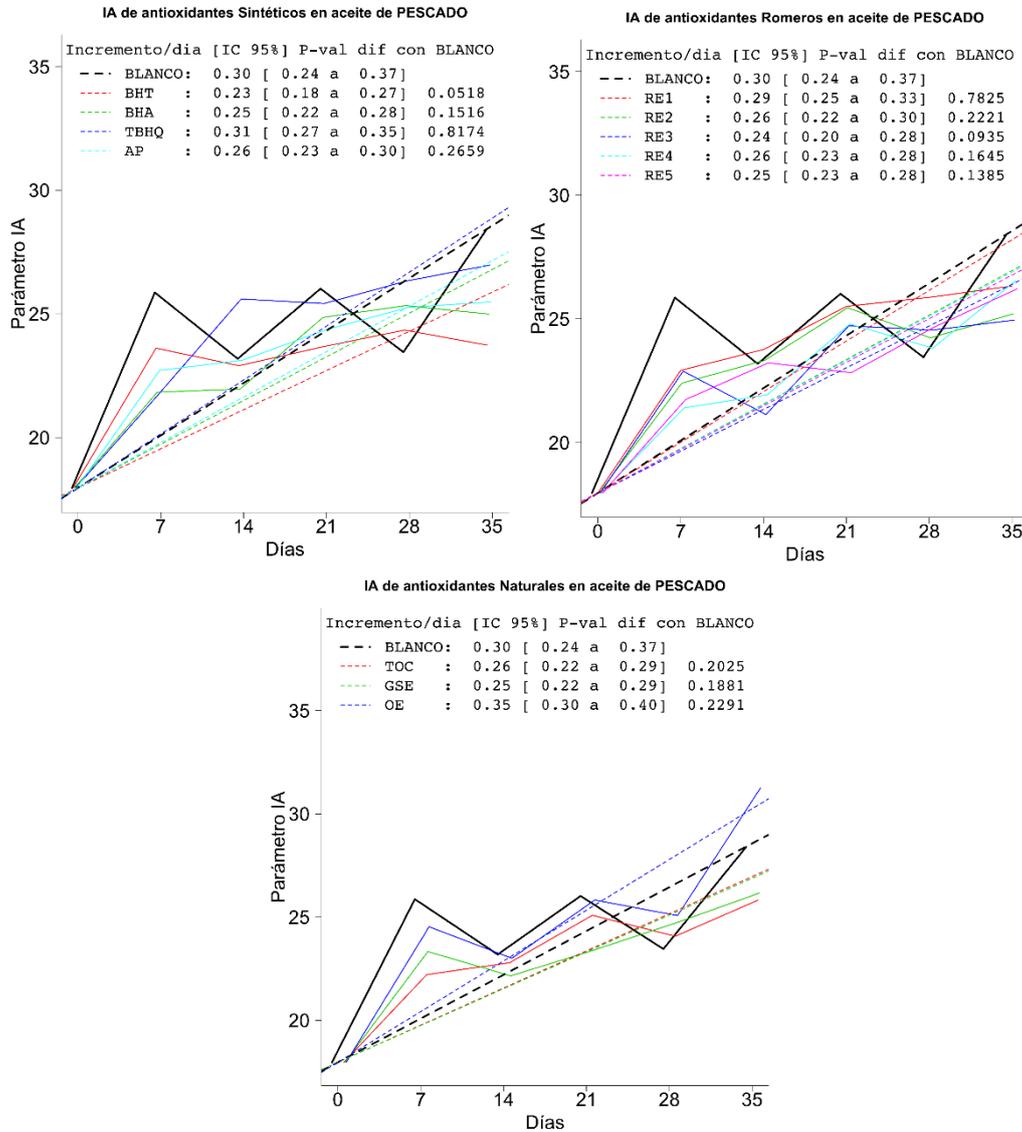
En la Figura 4.27, donde se comparan las tendencias de incremento de IA entre todas las muestras de aceite con antioxidante y el blanco, podemos observar que, no existen diferencias entre ellas. De nuevo, el carácter oscilante de la evolución del parámetro IA hace que las tendencias se estimen con más incertidumbre, por lo que es más difícil encontrar diferencias significativas entre ellas.

Al igual que para los dos aceites anteriormente estudiados, el estudio de la evolución del IA se extendió hasta los 5 meses (150 días) en las mismas condiciones de temperatura en el aceite de pescado.

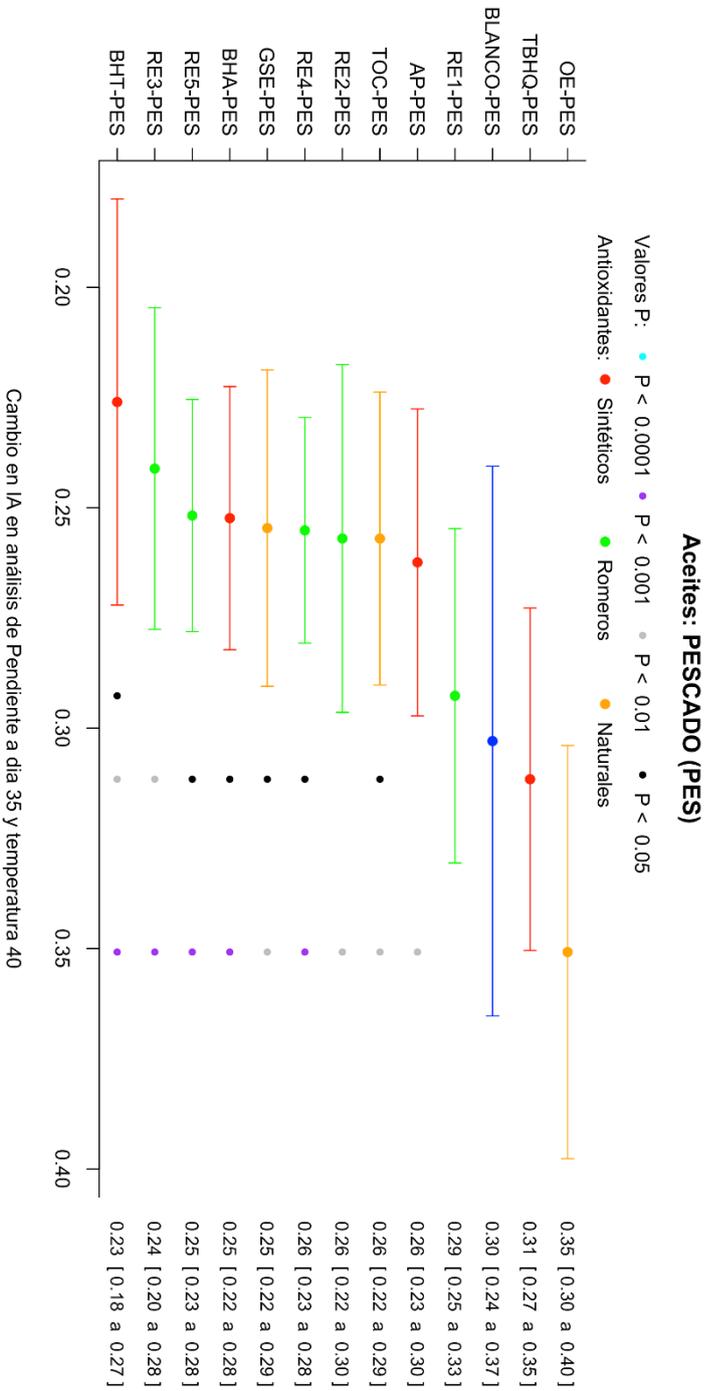
En la Figura 4.28 se refleja la diferencia del valor de IA ( $\Delta_{IA}$ ) en aceite de pescado entre el día 0 y el día 150 para cada antioxidante y el control. Al comparar el valor absoluto del incremento de IA que sufren las distintas muestras de aceite a largo plazo, lo primero que observamos es que en todas las muestras se produce un incremento considerable de este parámetro. Este incremento del parámetro IA a largo plazo puede justificar el descenso del parámetro observado a los 5 meses de envejecimiento en este mismo aceite, reflejando así el comportamiento teórico de las reacciones de oxidación lipídica, en las que los compuestos de oxidación primarios se descomponen para generar los productos de oxidación secundarios.

Observamos también en la Figura 4.28 que, salvo los antioxidantes TBHQ ( $\Delta_{IA}$  18,8) y BHT ( $\Delta_{IA}$  19,3) que muestran un incremento de IA similar al blanco ( $\Delta_{IA}$  19,0), todas las sustancias muestran un incremento en el valor de IA significativamente menor que la muestra control ( $p < 1e-04$  en todos los casos). Los antioxidantes naturales TOC ( $\Delta_{IA}$  11,8) y GSE ( $\Delta_{IA}$  12,2) son los que mejor protegen frente a la oxidación secundaria en el aceite de pescado, reduciendo el valor de IA entre un 30 y 35% a los 5 meses. Las siguientes sustancias que muestran más eficacia son el grupo compuesto por RE3 ( $\Delta_{IA}$  13,2), RE4 ( $\Delta_{IA}$  13,6), AP ( $\Delta_{IA}$  14,1) y RE1 ( $\Delta_{IA}$  14,2), reduciendo el valor de IA entre un 25 y 28%; el BHA ( $\Delta_{IA}$  15,1) que reduce un 20% el valor IA; y, finalmente, el grupo compuesto por los extractos vegetales RE2 ( $\Delta_{IA}$  16,2), OE ( $\Delta_{IA}$  16,4) y RE5 ( $\Delta_{IA}$  16,7) que lo reducen entre un 12 y un 15%.

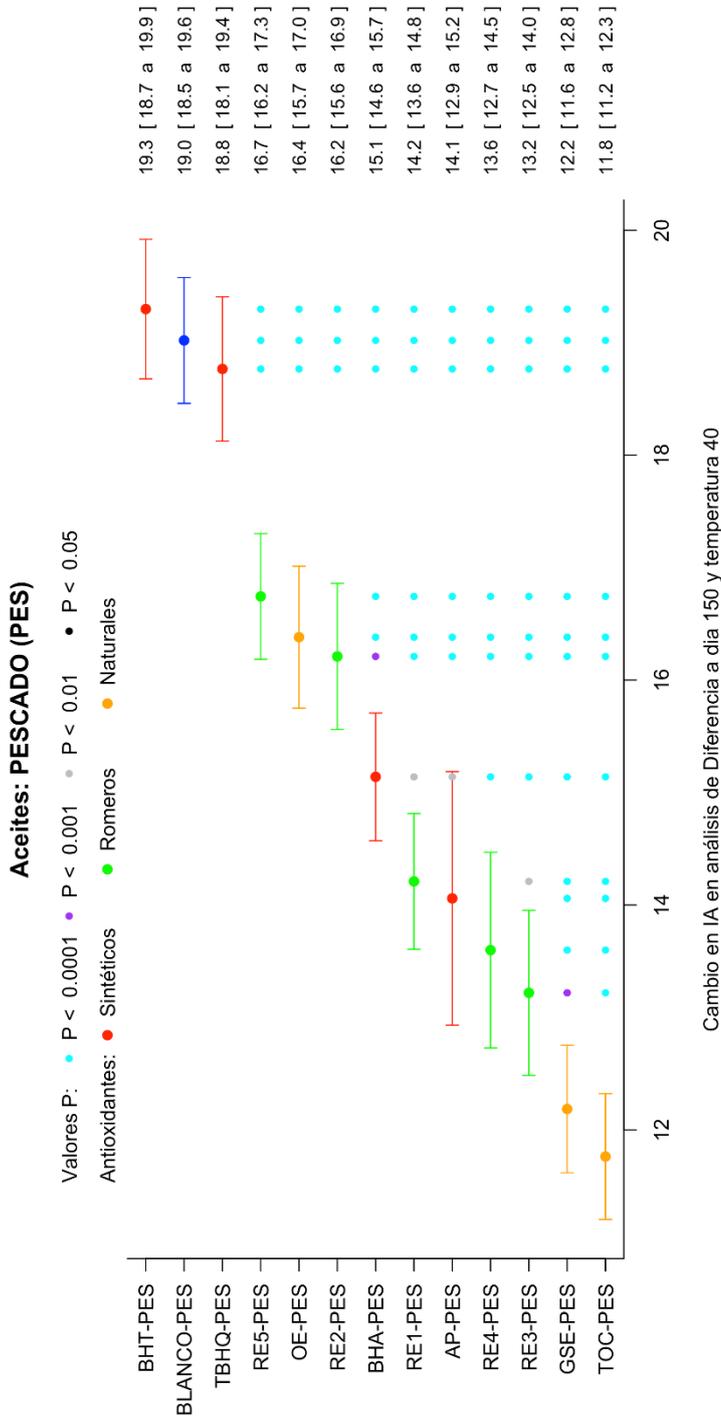
A pesar de que se aprecia un incremento general de IA en el aceite de pescado a largo plazo, este incremento no parece tan pronunciado como cabría esperar, dada la naturaleza altamente inestable del DHA, su ácido graso mayoritario. Debido a esta naturaleza lipídica, en el proceso estándar de fabricación este aceite es inmediatamente estabilizado con antioxidantes. En nuestro caso, pedimos al fabricante que nos proporcionase un lote de producto sin ningún antioxidante añadido. Observamos que los valores de partida (tiempo 0), tanto de IP (6,5) como de IA (18,0) (Anexo 4.3), ya son algo elevados, lo que indica que el aceite de partida ya había sufrido una oxidación considerable antes de empezar el ensayo, debido posiblemente a la ruptura de la atmósfera inerte en que venía envasado el aceite y a las etapas de manipulación del mismo para preparar las distintas muestras. Si bien, todas estas etapas se realizaron con máximo cuidado sometiendo al aceite y los materiales a un flujo de  $N_2$  continuo, los datos parecen indicar que en estas operaciones previas se produjera una oxidación importante. Este IA elevado en el aceite de pescado, nos permite explicar que el periodo de latencia sea más corto, ya que se sabe que a menor IA inicial más días se necesitan para que el IP aumente de modo importante.



**Figura 4.26.** Evolución del parámetro IA a lo largo de 35 días y tendencia (estimada con regresión lineal) para cada antioxidante y el blanco en el aceite de pescado envejecido a 40°C. En el eje de abscisas se representa el tiempo de envejecimiento (días) y en el de ordenadas se representa el parámetro IA. En la leyenda se refleja para cada antioxidante: la pendiente de la recta (incremento IA/día), su intervalo de confianza al 95% y el p-valor de la diferencia estadística de cada antioxidante respecto al blanco.



**Figura 4.27.** Gráfica comparativa del efecto de los distintos antioxidantes estudiados sobre la velocidad de evolución de parámetro IA (pendiente) en el aceite de pescado envejecido a 40°C. En el eje de ordenadas se muestran los antioxidantes ordenados ascendientemente en función del tamaño de su pendiente. En el eje de abscisas se representa el efecto de cada antioxidante expresado como incremento de IA/día. A la derecha se describe el valor medio de la pendiente junto con su intervalo de confianza al 95% entre paréntesis.



**Figura 4.28.** Gráfica comparativa del efecto de los distintos antioxidantes estudiados sobre el incremento del parámetro IA entre tiempo 0 y 150 días en el aceite de pescado envejecido a 40°C. En el eje de ordenadas se muestran los antioxidantes ordenados ascendentemente en función del incremento de IA. En el eje de abscisas se representa el incremento de IA para cada antioxidante. A la derecha se describe el valor medio del incremento de IA junto con su intervalo de confianza al 95% entre paréntesis.

## Valor Totox

Las conclusiones generales que pueden obtenerse en la evaluación de la oxidación total del aceite de pescado mediante el valor Totox, son algo complejas, debido a la variabilidad encontrada en los resultados de IP e IA previamente descritos.

La evolución del valor Totox en este aceite durante la primera etapa del envejecimiento a 40°C se refleja en la Figura 4.29. Si bien, a diferencia de lo que sucedía en GIR y SEM, en el aceite de pescado sí se produce un incremento considerable en valor de IA en esta primera etapa de envejecimiento, las tendencias de evolución de IA de todas las muestras apenas mostraron diferencia entre ellas. Como resultado observamos que, la evolución del valor Totox presenta, en esta primera etapa, el mismo comportamiento sinusoidal descrito para la evolución del parámetro IP de este mismo aceite.

Comparando el incremento del valor Totox/día (es decir, la pendiente de la recta de regresión lineal) de la muestra control (0,44/día) con el incremento Totox/día de las muestras con antioxidantes sintéticos (Figura 4.29), observamos que solo el BHT (0,21/día) presenta, aparentemente, capacidad de reducir la velocidad de oxidación total respecto al blanco ( $p < 0,001$ ). Sin embargo, los compuestos BHA (0,30/día), TBHQ (0,45/día) y AP (0,38/día), no manifestaron capacidad antioxidante en este aceite, mostrando una velocidad de oxidación total similar a la del aceite control sin antioxidantes (blanco).

Dentro del grupo de los RE (Figura 4.29) observamos que solo RE4 (15/día) y RE5 (0,25/día) muestras una reducción en la velocidad de incremento de IP estadísticamente significativa respecto al blanco ( $p < 1e-04$  y  $p < 0,01$ , respectivamente).

Dentro del grupo de otros antioxidantes naturales (Figura 4.29) encontramos que los extractos TOC (0,35/día) y OE (0,48/día) no presentan capacidad para retardar la oxidación total respecto al blanco. El extracto vegetal GSE (0,26/día) muestra una aparente reducción de la oxidación total respecto al blanco ( $p < 0,01$ ).

En la Figura 4.30 podemos observar que, al comparar el orden de eficacia para reducir la velocidad de oxidación total de todos los antioxidantes en PES, los

resultados obtenidos son, en general, muy distintos a los obtenidos para GIR y SEM.

Primeramente, observamos que, el extracto RE4 (0,15/día), que es uno de los extractos de romero que menos actividad manifestó para inhibir la formación de compuestos de oxidación primaria en GIR y SEM es, en este caso, el que mejor comportamiento presenta de todos los antioxidantes estudiados, mostrando diferencias estadísticamente significativas con todo salvo con el BHT (0,21/día). Este antioxidante sintético, que tampoco mostró actividad en la reducción de IP durante la primera etapa de oxidación en los aceites anteriores, muestra mejores resultados que la mayoría de ellos sobre PES. RE5 (0,25/día) y GSE (0,26/día) parecen mostrar también mejor comportamiento que las demás sustancias en cuanto a su capacidad para reducir el valor Totox. EL resto de los antioxidantes estudiados: BHA, RE3, TOC, RE1, AP, OE, RE2 y TBHQ, no muestran diferencias significativas entre sus efectos.

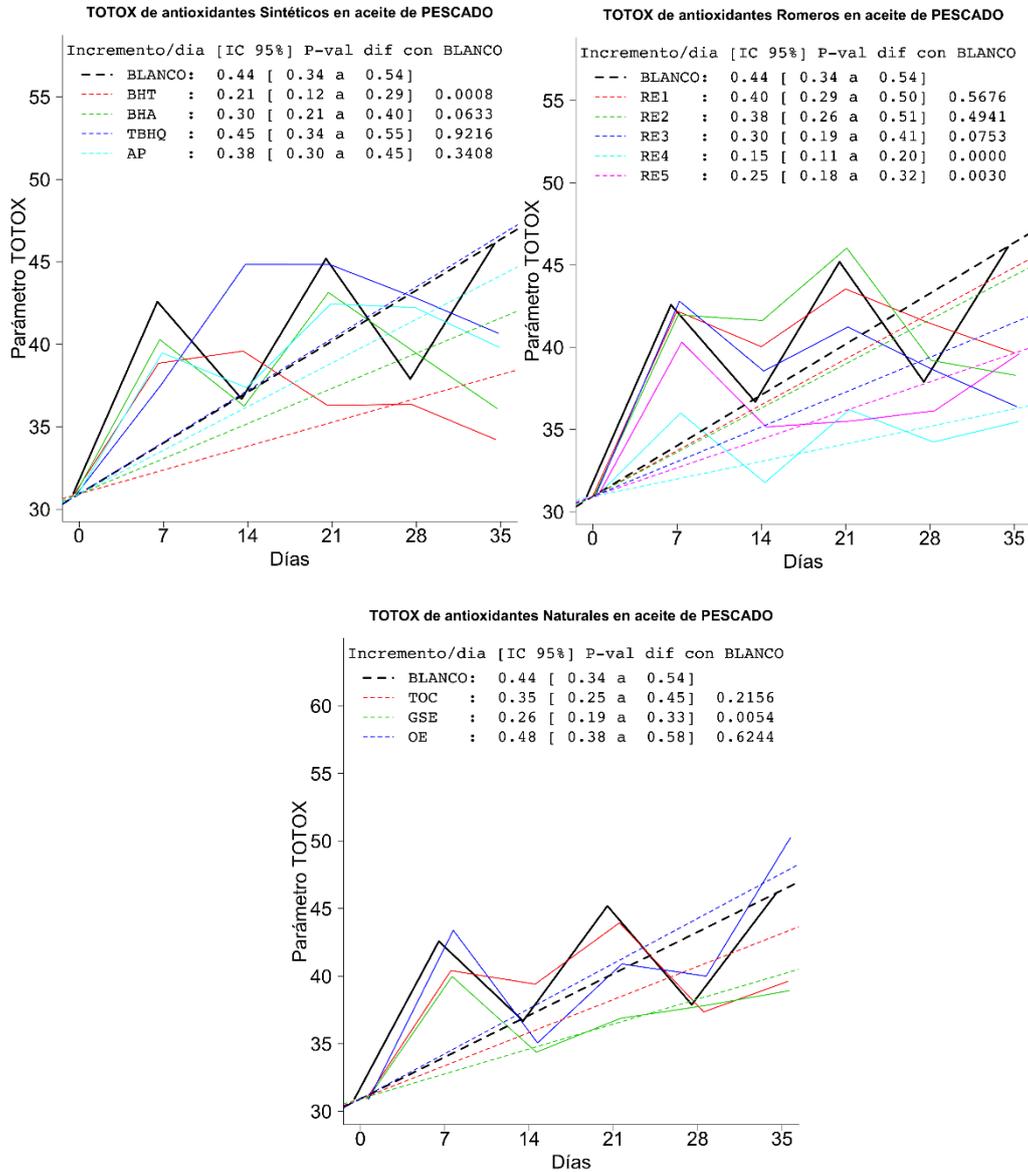
Conviene mencionar de nuevo que la variabilidad encontrada en la evolución de Totox da como resultado la estimación de con más incertidumbre, por lo que es más difícil encontrar diferencias significativas entre ellas.

Al igual que para los dos aceites anteriormente estudiados, el estudio de la evolución de Totox se extendió hasta los 5 meses (150 días) en las mismas condiciones de temperatura.

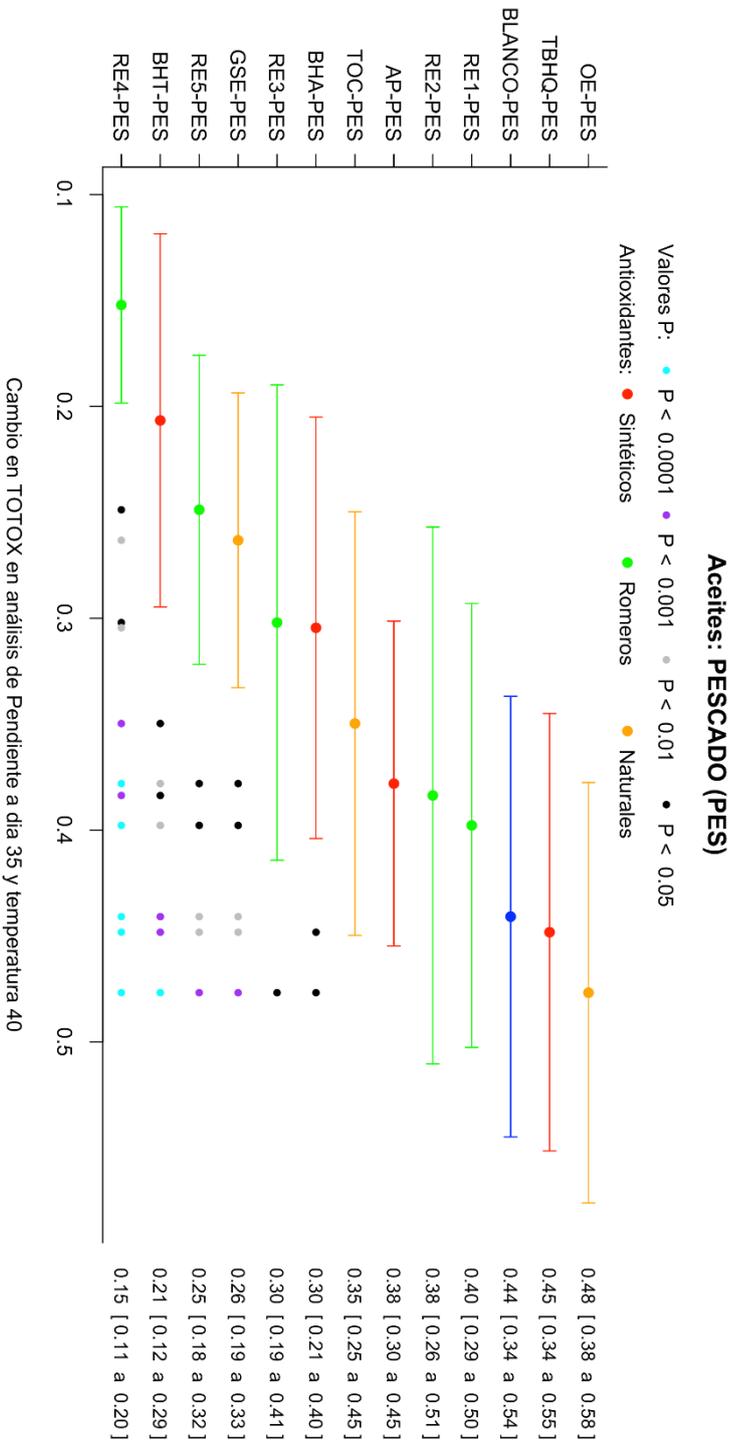
En la Figura 4.31 se refleja la diferencia del valor de Totox ( $\Delta_{\text{TOTX}}$ ) en PES entre el día 0 y el día 150 para cada antioxidante y el control. Al comparar el valor absoluto del incremento de Totox que sufren las muestras de aceite a largo plazo, observamos primeramente que, las conclusiones que se pueden extraer a partir de ellos pueden ofrecer información sesgada. Esto es debido a que los resultados de IP obtenidos para este mismo aceite a los 5 meses mostraban un descenso significativo que no tiene por qué indicar que no haya habido oxidación, sino más bien todo lo contrario. Como ya hemos descrito en esta memoria, la velocidad de descomposición de los hidroperóxidos aumenta progresivamente a medida que aumenta el grado de oxidación de modo que, puede suceder que el proceso de descomposición tenga lugar más rápidamente que la formación de nuevos hidroperóxidos, como resultado niveles falsamente bajos de estos compuestos

(Paschke & Wheeler, 1944). Por este motivo, se incluye el parámetro IA en la cuantificación del valor Totox, con el fin de cuantificar también la descomposición de estos hidroperóxidos en compuestos con funciones carbonilo. Sin embargo, no se ha desarrollado una correlación fiable entre la reducción del valor de IP y el aumento simultáneo del valor de IA (Strecker *et al.*, 1990).

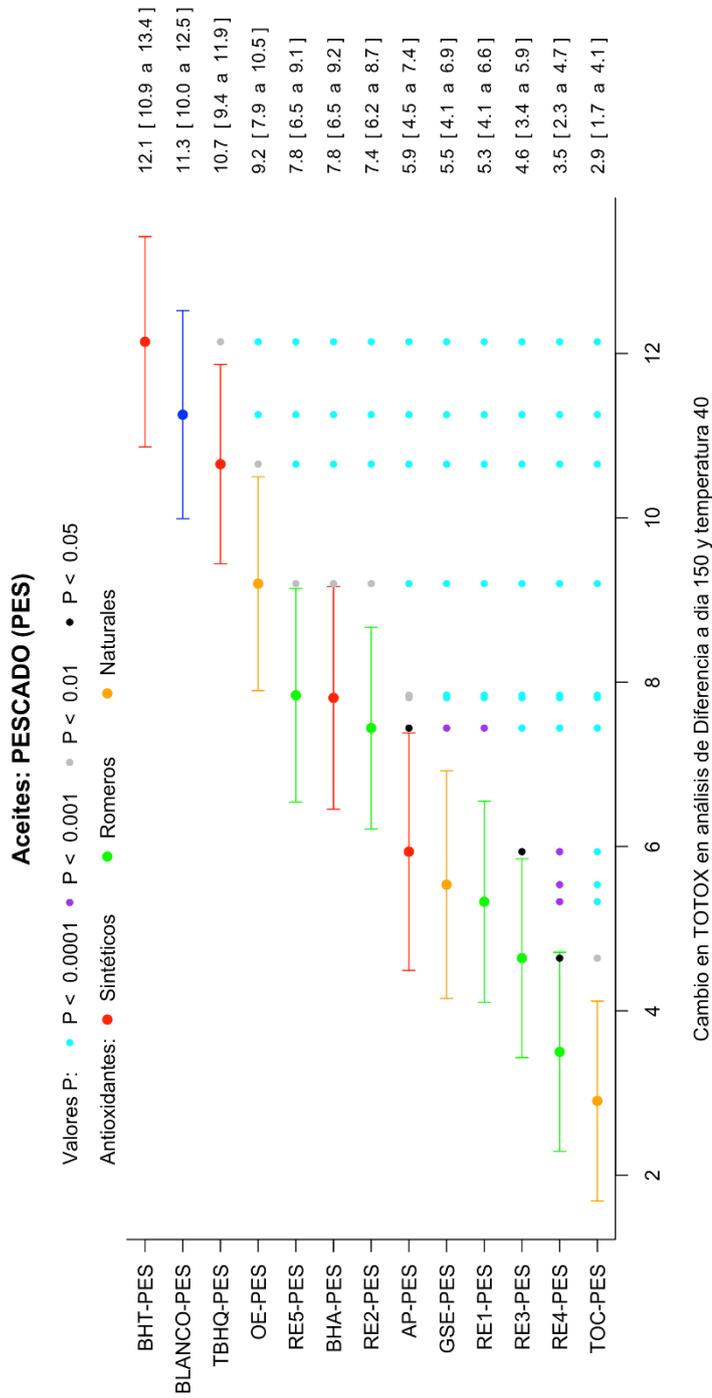
Por este motivo, los datos obtenidos en esta fase de estudio para el valor Totox en el aceite de pescado no son representativos de la oxidación total. No ha sido posible establecer de forma suficientemente sólida una relación estructura-actividad antioxidante.



**Figura 4.29.** Evolución del valor Totox a lo largo de 35 días y tendencia (estimada con regresión lineal) para cada antioxidante y el blanco en el aceite de pescado envejecido a 40°C. En el eje de abscisas se representa el tiempo de envejecimiento (días) y en el de ordenadas se representa el parámetro Totox. En la leyenda se refleja para cada antioxidante: la pendiente de la recta (incremento Totox/día), su intervalo de confianza al 95% y el p-valor de la diferencia estadística de cada antioxidante respecto al blanco.



**Figura 4.30.** Gráfica comparativa del efecto de los distintos antioxidantes estudiados sobre la velocidad de evolución de valor Totox (pendiente) en el aceite de pescado envejecido a 40°C. En el eje de ordenadas se muestran los antioxidantes ordenados ascendientemente en función del tamaño de su pendiente. En el eje de abscisas se representa el efecto de cada antioxidante expresado como incremento de Totox/día. A la derecha se describe el valor medio de la pendiente junto con su intervalo de confianza al 95% entre paréntesis.



**Figura 4.31.** Gráfica comparativa del efecto de los distintos antioxidantes estudiados sobre el incremento del valor Totox entre tiempo 0 y 150 días en el aceite de pescado envejecido a 40°C. En el eje de ordenadas se muestran los antioxidantes ordenados ascendentemente en función del incremento de Totox. En el eje de abscisas se representa el incremento de Totox para cada antioxidante. A la derecha se describe el valor medio del incremento de Totox junto con su intervalo de confianza al 95% entre paréntesis.

#### 4.3.2. Envejecimiento acelerado en estufa a 60°C

Es importante considerar que, inicialmente, no estaba previsto, en el presente capítulo de este proyecto de tesis, el estudio de la estabilidad de los aceites, con y sin antioxidantes, a temperaturas superiores a 40°C. Dado el carácter industrial de esta Tesis, el objetivo más importante para nosotros respondía a la evaluación de la estabilidad de aceites en almacenaje a la temperatura más alta dentro de un rango ambiental y razonablemente posible. Industrialmente, no se almacenan aceites a temperaturas superiores a 40°C.

El estudio de la estabilidad oxidativa de estos aceites, con y sin antioxidantes, a temperaturas elevadas (75-120°C) correspondía al capítulo 5 en el que la técnica de evaluación de la estabilidad utiliza el método Rancimat. Sin embargo, una vez concluido el estudio de estabilidad a 40°C y, en función de la evolución de los índices IP e IA, se decidió incluir en este apartado una pequeña experiencia, que podría ser considerada preliminar para futuros estudios, de evaluación de la estabilidad de los aceites a 60°C, una temperatura elevada pero que no entra en el rango de los estudios con Rancimat.

Para ello se emplearon los aceites control que ya habían sido evaluados tras 35 días a 40°C, es decir, que ya habían mostrado una significativa subida del IP, pero muy escasa, o casi nula del IA en el caso de GIR y SEM. Estos aceites se usaron como control en la prueba y fueron también la base para adicionar todos los antioxidantes empleados en este estudio. A pesar de tratarse de una experiencia no programada inicialmente, los resultados obtenidos son realmente interesantes y permiten, como se verá, obtener ciertas conclusiones básicas sobre la relación/equilibrio entre las dos reacciones de oxidación que ya hemos descrito: formación de hidroperóxidos (IP) y generación de compuestos con grupos carbonilo/aldehídos (IA).

El comportamiento/estabilidad de los tres aceites estudiados, con y sin antioxidantes, durante un periodo de 35 días (5 semanas) a 60°C se ha evaluado únicamente a través de la comparativa entre los resultados de los índices IP e IA obtenidos en el momento inicial de la prueba (tiempo 0) y a los 35 días (tiempo final). No se calculó el valor Totox en este caso, pues podría enmascarar el efecto

oxidativo real de la T<sup>a</sup> 60°C sobre los aceites y conducir a conclusiones de aplicabilidad equívocas.

Para la descripción y análisis estadístico de los resultados obtenidos en esta prueba de estabilidad a 60°C se utilizó un tipo de gráfica similar a la utilizada para comparar el incremento de los valores IP, IA y Totox a los 5 meses de almacenamiento a 40°C.

**Gráficas de análisis comparativo de diferencia entre día 0 y día 35 de cada parámetro (IP o IA) para cada antioxidante y para el control (blanco) en prueba de estabilidad a 60°C.** Esta gráfica es idéntica a las utilizadas en la estabilidad a 40°C en cuanto su modo de lectura e interpretación (ver en pag. 204). En este caso lo que se compara es la diferencia del valor obtenido para cada parámetro (IP, IA) a tiempo 0 y a los 35 días entre los distintos antioxidantes y el blanco. Este el tipo de gráficas que vemos reflejadas en las Figuras: 4.33, 4.34, 4.36, 4.37; 4.39 y 4.40.

#### 4.3.2.1. Aceite de girasol

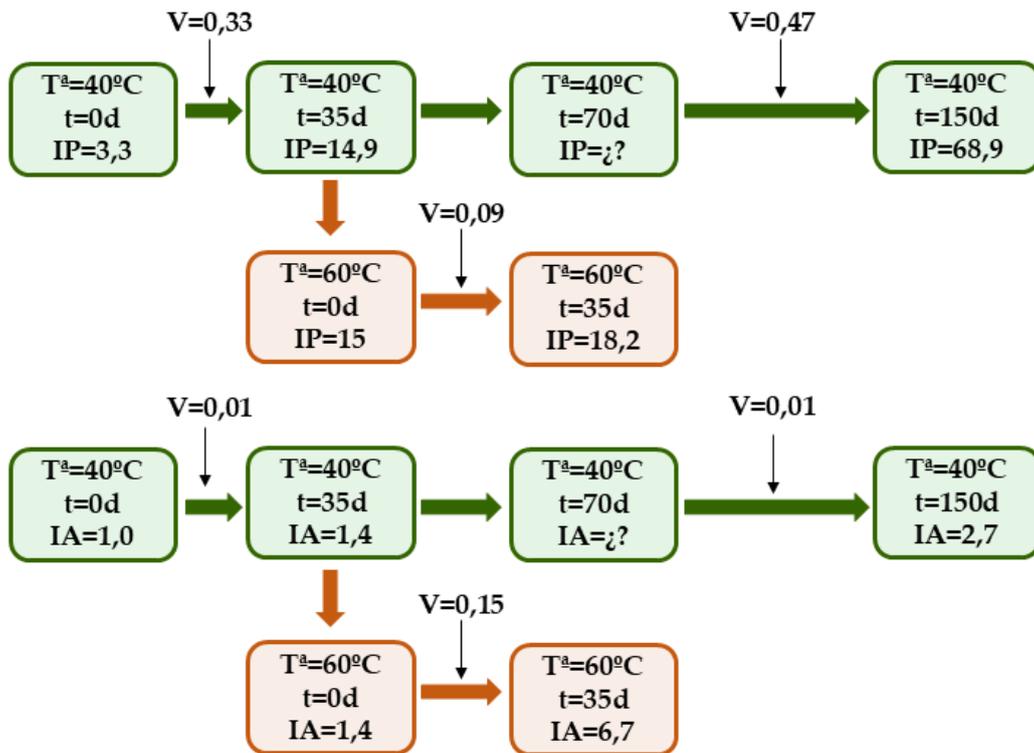
Los resultados de la evolución de los parámetros IP e IA obtenidos para el aceite control de GIR en las pruebas de estabilidad a 40° y 60°C se resumen en la Tabla 4.2. Los resultados numéricos obtenidos para cada una de las muestras estudiadas pueden consultarse en el Anexo 4.4.

**Tabla 4.2.** Tabla resumen de resultados de IP e IA de muestra control de aceite de girasol alto oleico en las pruebas de estabilidad en estufa a 40 y 60°C.

Índice	Estabilidad 40°C			Estabilidad 60°C	
	Tiempo (días)			Tiempo (días)	
	t=0	t=35	t=150	t=0	t=35
IP	3,30 ±0,04	14,87 ±0,30	68,94 ±1,04	15,07 ±0,32	18,22 ±0,79
IA	1,00 ±0,04	1,36 ±0,07	2,75 ±0,72	1,42 ±0,07	6,72 ±0,20

Resultados expresados como media ±SD (n=3).

Con el fin de estudiar el comportamiento del aceite de girasol alto oleico en cuanto a su estabilidad oxidativa en función de parámetros como tiempo (t) y temperatura ( $T^a$ ), los resultados descritos en la Tabla 4.2 podrían representarse a través del esquema reflejado en la Figura 4.32 en el que se indica la relación en la evolución de los valores de los índices IP e IA del aceite control obtenidos en las distintas pruebas de estabilidad a 40° y 60°C°, así como la velocidad de incremento de dichos índices en cada una de las etapas. Este cálculo se ha realizado dividiendo el incremento del índice (IP ó IA) por el número de días transcurridos en cada etapa.



**Figura 4.32.** Esquema representativo de la evolución de los índices IP e IA en la muestra control del aceite de girasol alto oleico en función del tiempo (t) y la temperatura ( $T^a$ ). La velocidad (V) de incremento de IP e IA en un periodo de tiempo determinado se expresa en unidades de IP ó IA/día.

En base al esquema representado en la Figura 4.32 podemos sacar las siguientes conclusiones:

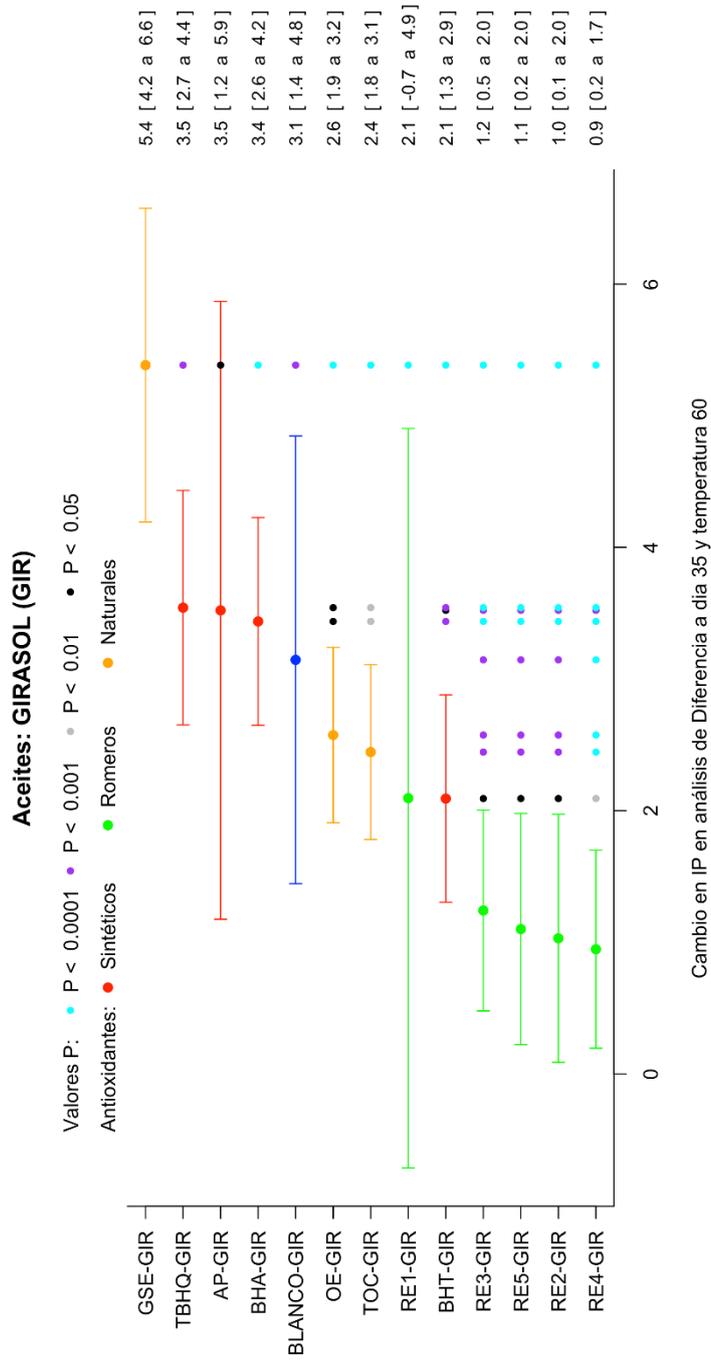
- A una  $T^a$  de 40°C resulta evidente una progresiva acumulación de hidroperóxidos (IP), con una evolución que podría considerarse relativamente lineal: rango entre 0,33 unidades IP/día y 0,47 unidades IP/día.
- A una  $T^a$  de 40°C la generación de compuestos con grupos carbonilo (IA) a partir de los hidroperóxidos formados, resulta muy reducida, con una evolución prácticamente lineal y constante de 0,01 unidades IA/día.
- A una  $T^a$  de 60°C obviamente se incrementa la generación de hidroperóxidos (IP), pero estos no se acumulan de forma significativa (0,09 unidades IP/día), sugiriendo su transformación en compuestos carbonílicos (IA).
- A una  $T^a$  de 60°C la generación de compuestos con grupos carbonilo (IA) a partir de los hidroperóxidos formados, resulta muy significativa, con una evolución promedio de 0,15 unidades IA/día, es decir, unas 14 veces superior que a 40°C.

El estudio de estabilidad a 40°C, nos había proporcionado una serie de conclusiones estructurales acerca de la capacidad de cada uno de los compuestos antioxidantes estudiados sobre el control de la formación de hidroperóxidos en GIR. En la Figura 4.33 se refleja la diferencia del valor de IP ( $\Delta_{IP}$ ) en la prueba de estabilidad a 60°C entre el día 0 y el día 35 para cada antioxidante y el control. Al comparar los valores absolutos del incremento de IP observamos que esta experiencia de 35 días a 60°C no muestra diferencias muy significativas en cuanto a la acumulación de estos compuestos en ninguna de las muestras de aceite con antioxidantes. La velocidad “estacionaria” de acumulación de hidroperóxidos varía entre 0,03 –0,10 unidades IP/día, muy similar a la del aceite control (0,09 unidades IP/día). Es decir, de forma preliminar, podríamos sugerir que, en las condiciones de este ensayo, ninguno de los antioxidantes estudiados es capaz de evitar drásticamente la generación de compuestos con grupos carbonilo, lo que hubiera supuesto, en mayor o menor grado, que continuara la acumulación de hidroperóxidos y, por tanto, el aumento del IP. Únicamente cuatro de los cinco

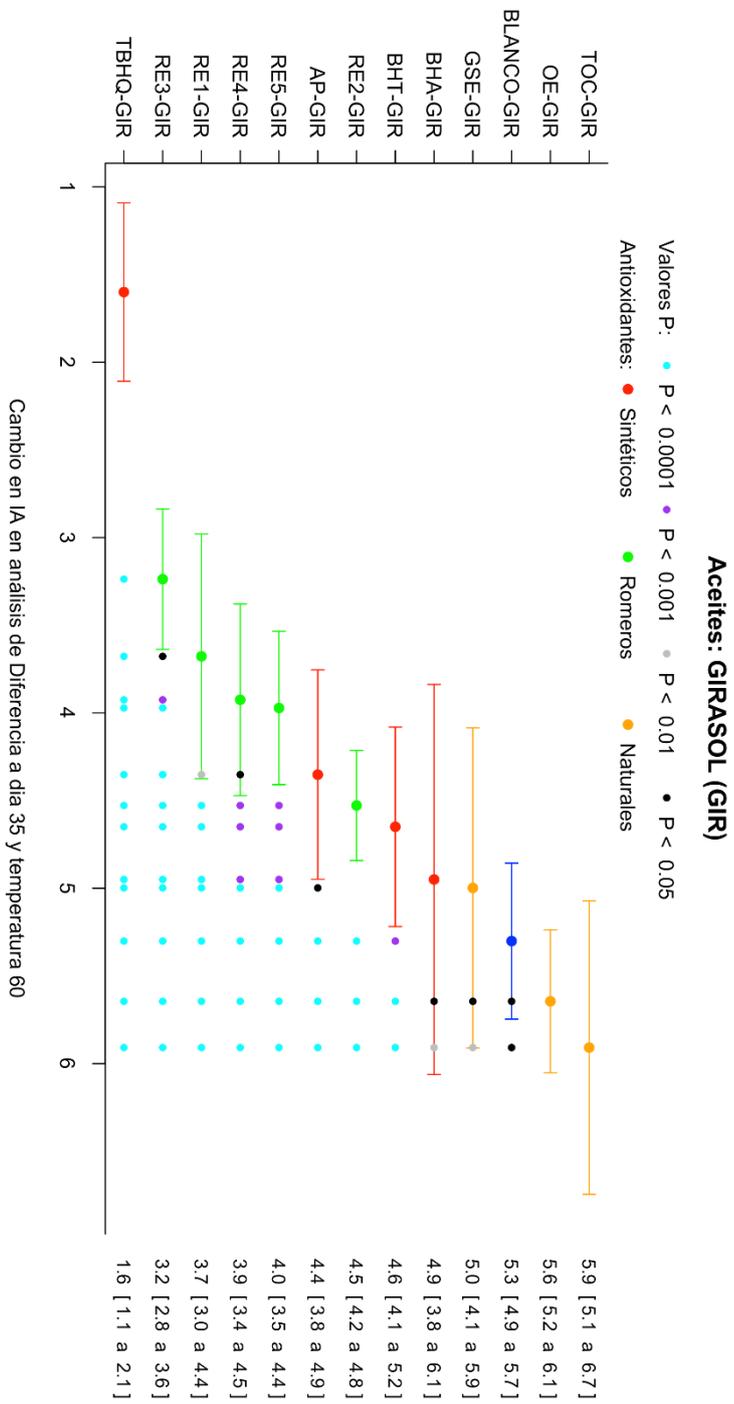
extractos de romero estudiados (RE3, RE5, RE2 y RE4) muestra diferencias estadísticamente significativas respecto al blanco en su capacidad para reducir el incremento de IP ( $p < 0,001$  para los tres primeros y  $p < 1e-04$  para RE4).

El diferente comportamiento en la evolución del índice IA ( $\Delta_{IA}$ ), en las condiciones de este ensayo, descrito en la Figura 4.34, sí que nos indica cual es la capacidad particular de cada compuesto para reducir la velocidad de generación de compuestos carbonilo y otras reacciones posteriores de oxidación.

El compuesto sintético BHA, los TOC, así como los dos extractos OE y GSE no muestran capacidad antioxidante para controlar la formación de especies carbonilo. Los sintéticos BHT y AP, presentan una capacidad muy reducida, en el rango 13-17%, para reducir la formación de estos compuestos respecto al control ( $p < 0,001$  y  $p < 1e-04$  respectivamente). La mayor parte de extractos de romero muestran un comportamiento similar, con una capacidad de reducción en el rango 15-30%, aproximadamente; el extracto de romero RE3 es capaz de reducir un 40% la velocidad de esta segunda etapa de oxidación ( $p < 1e-04$  para todos los RE), aunque no podemos explicar inicialmente cual es la razón de esta diferencia respecto al resto de extractos de romero. El antioxidante que presenta los mejores resultados es TBHQ, con una reducción del índice IA del 65%, aproximadamente ( $p < 1e-04$ ).



**Figura 4.33.** Gráfica comparativa del efecto de los distintos antioxidantes estudiados sobre el incremento del parámetro IP entre tiempo 0 y 35 días en el aceite de girasol alto oleico envejecido a 60°C. En el eje de ordenadas se muestran los antioxidantes ordenados ascendientemente en función del incremento de IP. En el eje de abscisas se representa el incremento de IP para cada antioxidante. A la derecha se describe el valor medio del incremento de IP junto con su intervalo de confianza al 95% entre paréntesis.



**Figura 4.34.** Gráfica comparativa del efecto de los distintos antioxidantes estudiados sobre el incremento del parámetro IA entre tiempo 0 y 35 días en el aceite de girasol alto oleico envejecido a 60°C. En el eje de ordenadas se muestran los antioxidantes ordenados ascendientemente en función del incremento de IA. En el eje de abscisas se representa el incremento de IA para cada antioxidante. A la derecha se describe el valor medio del incremento de IA junto con su intervalo de confianza al 95% entre paréntesis.

#### 4.3.2.2. Aceite de semilla de uva

Los resultados de la evolución de los parámetros IP e IA obtenidos para el aceite control de SEM en las pruebas de estabilidad a 40° y 60°C se resumen en la Tabla 4.3. Los resultados numéricos obtenidos para cada una de las muestras estudiadas pueden consultarse en el Anexo 4.4.

**Tabla 4.3.** Tabla resumen de resultados de IP e IA de muestra control de aceite de semilla de uva en las pruebas de estabilidad en estufa a 40 y 60°C.

Índice	Estabilidad 40°C			Estabilidad 60°C	
	Tiempo (días)			Tiempo (días)	
	t=0	t=35	t=150	t=0	t=35
<b>IP</b>	3,07 ±0,09	17,53 ±0,15	48,73 ±1,9	17,87 ±0,32	23,67 ±0,69
<b>IA</b>	9,79 ±0,16	9,77 ±0,13	11,73 ±0,02	9,9 ±0,31	15,38 ±0,36

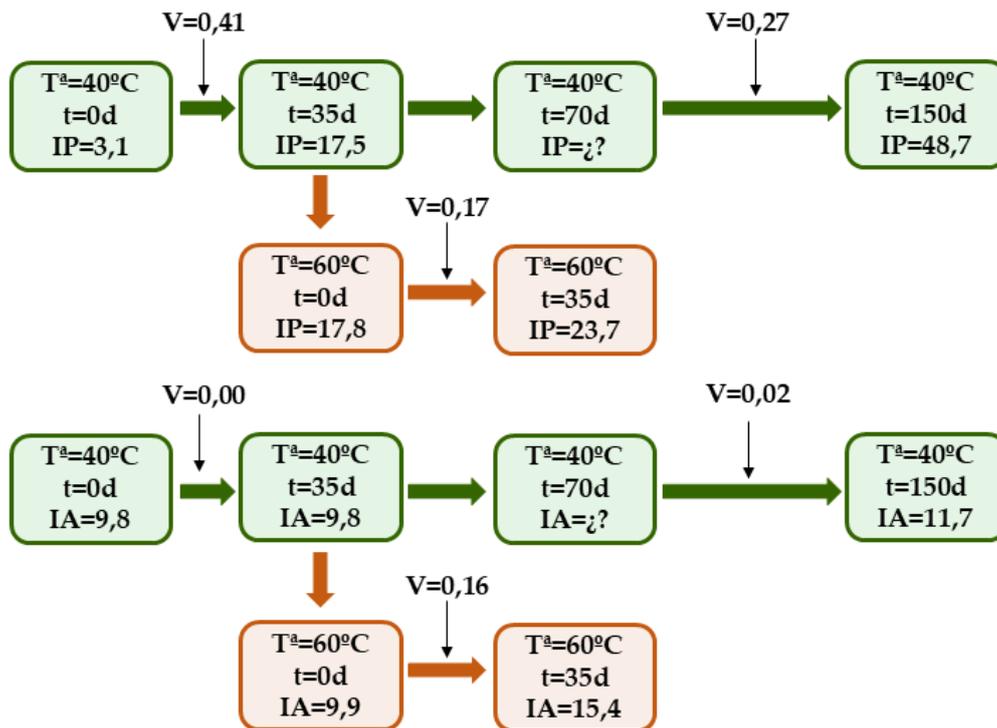
Resultados expresados como media ±SD (n=3).

Al igual que hemos hecho para el aceite de girasol alto oleico, con el fin de estudiar el comportamiento del aceite de semilla de uva en cuanto a su estabilidad oxidativa en función de parámetros como t y T<sup>a</sup>, los resultados descritos en la Tabla 4.3 podrían representarse a través del esquema reflejado en la Figura 4.35 en el que se indica la relación en la evolución de los valores de los índices IP e IA del aceite control obtenidos en las distintas pruebas de a 40° y 60°C°. Así como la V de incremento de dichos índices en cada una de las etapas.

En base al esquema representado en la Figura 4.35 podemos sacar las siguientes conclusiones:

- A una T<sup>a</sup> de 40°C resulta evidente una progresiva acumulación de hidroperóxidos (IP), con una evolución que podría considerarse relativamente lineal (rango 0,27–0,41 unidades IP/día).

- A una  $T^a$  de  $40^\circ\text{C}$  la generación de compuestos con grupos carbonilo (IA) a partir de los hidroperóxidos formados, resulta muy reducida, con una evolución prácticamente lineal y constante de 0,02 unidades IA/día.
- A una  $T^a$  de  $60^\circ\text{C}$  obviamente se incrementa la generación de hidroperóxidos (IP), pero estos no se acumulan de forma significativa (0,17 unidades IP/día), sugiriendo su transformación en compuestos carbonílicos (IA). No obstante, esta velocidad de acumulación es superior a la que mostraba el aceite de girasol.
- A una  $T^a$  de  $60^\circ\text{C}$  la generación de compuestos con grupos carbonilo (IA) a partir de los hidroperóxidos formados, resulta muy significativa, con una evolución promedio de 0,16 unidades IA/día, es decir, unas 10 veces superior que a  $40^\circ\text{C}$ .

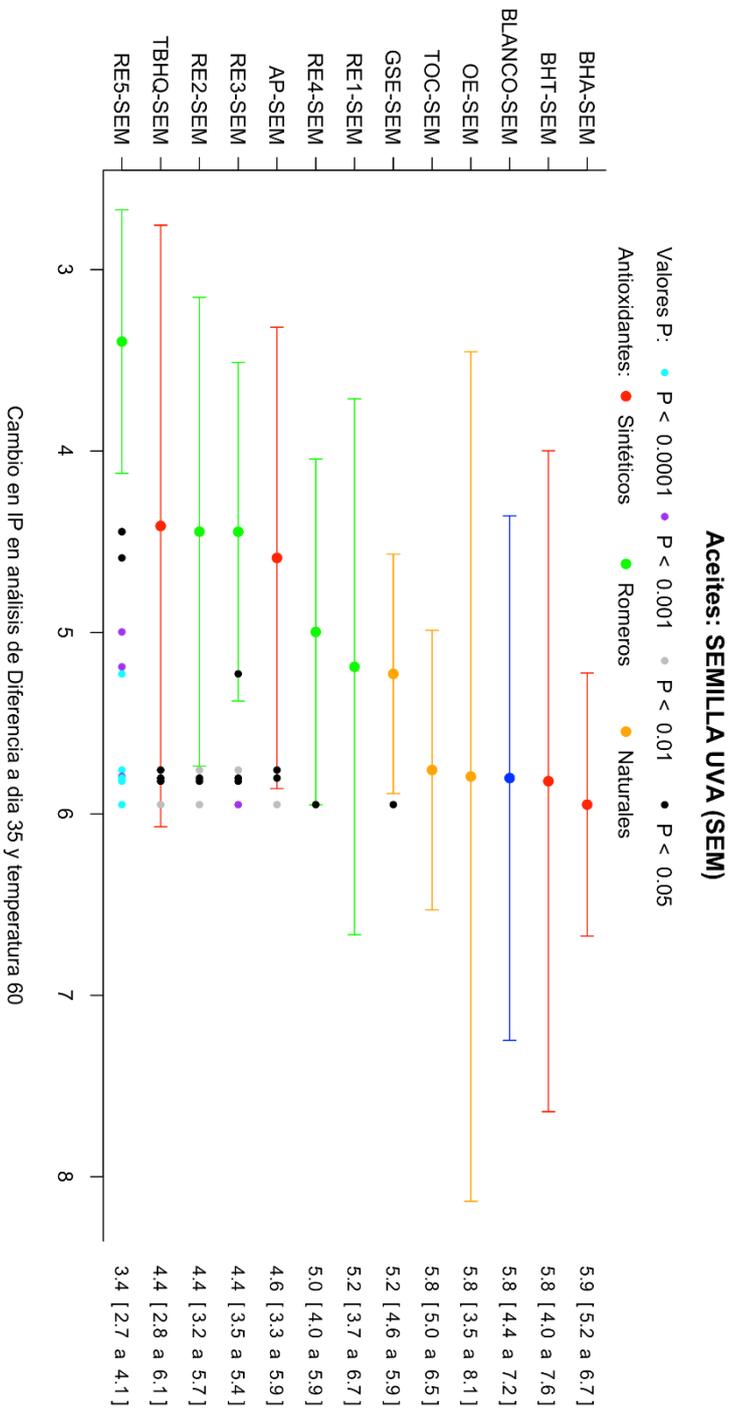


**Figura 4.35.** Esquema representativo de la evolución de los índices IP e IA en la muestra control del aceite de semilla de uva en función del tiempo (t) y la temperatura ( $T^a$ ). La velocidad (V) de incremento de IP e IA en un periodo de tiempo determinado se expresa en unidades de IP ó IA/día.

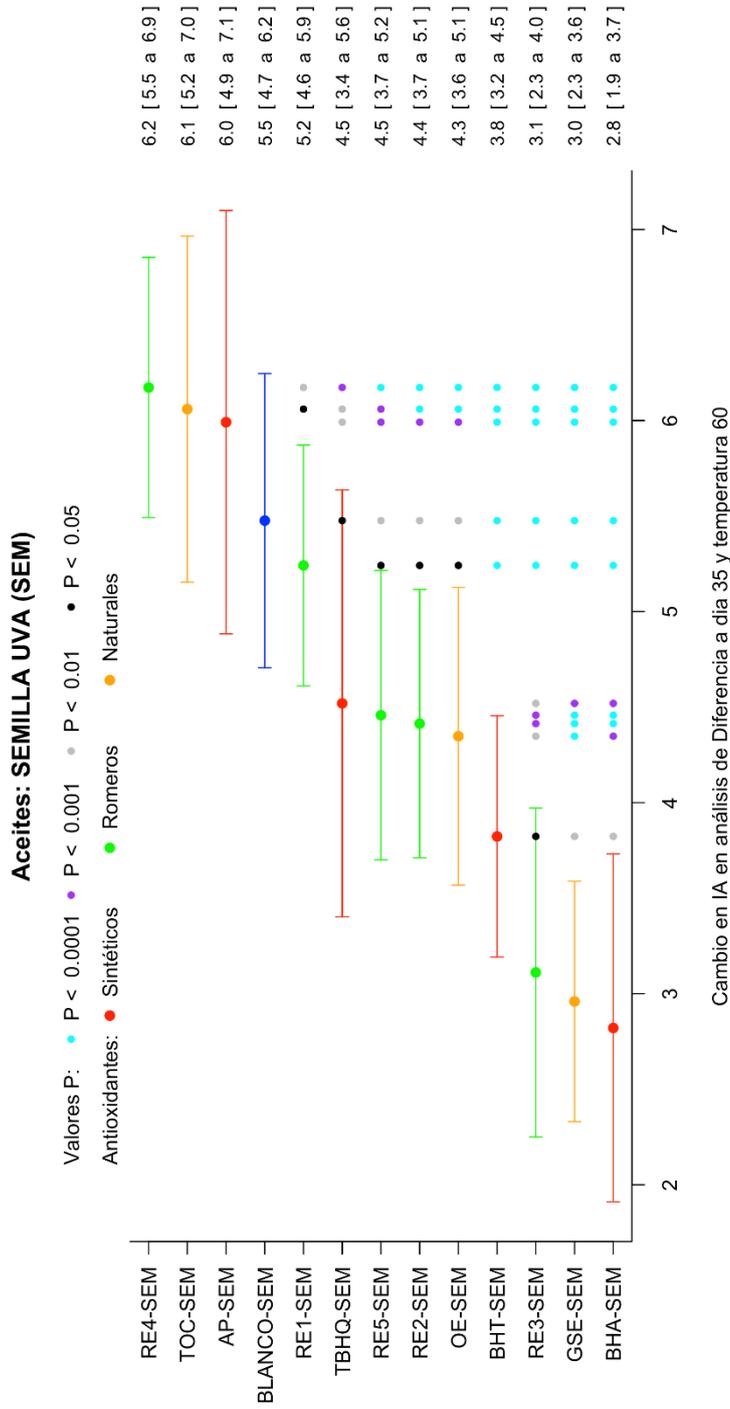
El estudio de estabilidad a 40°C, no nos había proporcionado conclusiones estructurales acerca de la capacidad de cada uno de los compuestos estudiados sobre el control de la formación de hidroperóxidos en este aceite de una forma tan clara como en el caso del aceite de girasol alto oleico. En la Figura 4.36 se refleja la diferencia del valor de IP ( $\Delta_{IP}$ ) en la prueba de estabilidad a 60°C entre el día 0 y el día 35 para cada antioxidante y el control en el aceite de semilla de uva. Al comparar los valores absolutos del incremento de IP observamos que esta experiencia de 35 días a 60°C no muestra diferencias significativas en cuanto a la acumulación de estos compuestos en ninguna de las muestras de aceite con antioxidantes. La velocidad “estacionaria” de acumulación de hidroperóxidos varía entre 0,10 y 0,18 unidades IP/día, muy similar a la del aceite control (0,17 unidades IP/día). Es decir, de forma preliminar, podríamos sugerir que, en las condiciones de este ensayo, ninguno de los antioxidantes estudiados es capaz de evitar drásticamente la generación de compuestos con grupos carbonilo, lo que hubiera supuesto, en mayor o menor grado, que continuara la acumulación de hidroperóxidos y, por tanto, el aumento del IP. Únicamente el extracto de romero RE5 muestra una capacidad reducir el valor de IP estadísticamente significativa ( $p < 1e-04$ ).

El diferente comportamiento en la evolución del índice IA ( $\Delta_{IA}$ ), en las condiciones de este ensayo, descrito en la Figura 4.37, tampoco nos sugiere diferencias entre los distintos antioxidantes en relación con su capacidad específica para reducir la velocidad de generación de compuestos carbonilo y otras reacciones posteriores de oxidación.

El compuesto sintético AP, los TOC, así como los dos extractos de romero RE1 y RE4, no muestran capacidad antioxidante para controlar la formación de especies carbonilo en el aceite de semilla de uva. El sintético TBHQ, los extractos de romero RE2 y RE5, así como el extracto OE, presentan una capacidad reducida de en torno al 20% ( $p < 0.05$  para TBHQ y  $p < 0,01$  para los tres extractos). El sintético BHT muestra una capacidad de reducción del 30% ( $p < 1e-04$ ) y el extracto de romero RE3, junto con el sintético BHA y el extracto GSE, son capaces de reducir un 45-50% la velocidad de esta segunda etapa de oxidación ( $p < 1e-04$  para todos los casos). Con esta distribución de datos no es posible realizar alguna hipótesis estructura-actividad.



**Figura 4.36.** Gráfica comparativa del efecto de los distintos antioxidantes estudiados sobre el incremento del parámetro IP entre tiempo 0 y 35 días en el aceite de semilla de uva envejecido a 60°C. En el eje de ordenadas se muestran los antioxidantes ordenados ascendientemente en función del incremento de IP. En el eje de abscisas se representa el incremento de IP para cada antioxidante. A la derecha se describe el valor medio del incremento de IP junto con su intervalo de confianza al 95% entre paréntesis.



**Figura 4.37.** Gráfica comparativa del efecto de los distintos antioxidantes estudiados sobre el incremento del parámetro IA entre tiempo 0 y 35 días en el aceite de semilla de uva envejecido a 60°C. En el eje de ordenadas se muestran los antioxidantes ordenados ascendentemente en función del incremento de IA. En el eje de abscisas se representa el incremento de IA para cada antioxidante. A la derecha se describe el valor medio del incremento de IA junto con su intervalo de confianza al 95% entre paréntesis.

#### 4.3.2.3. Aceite de pescado

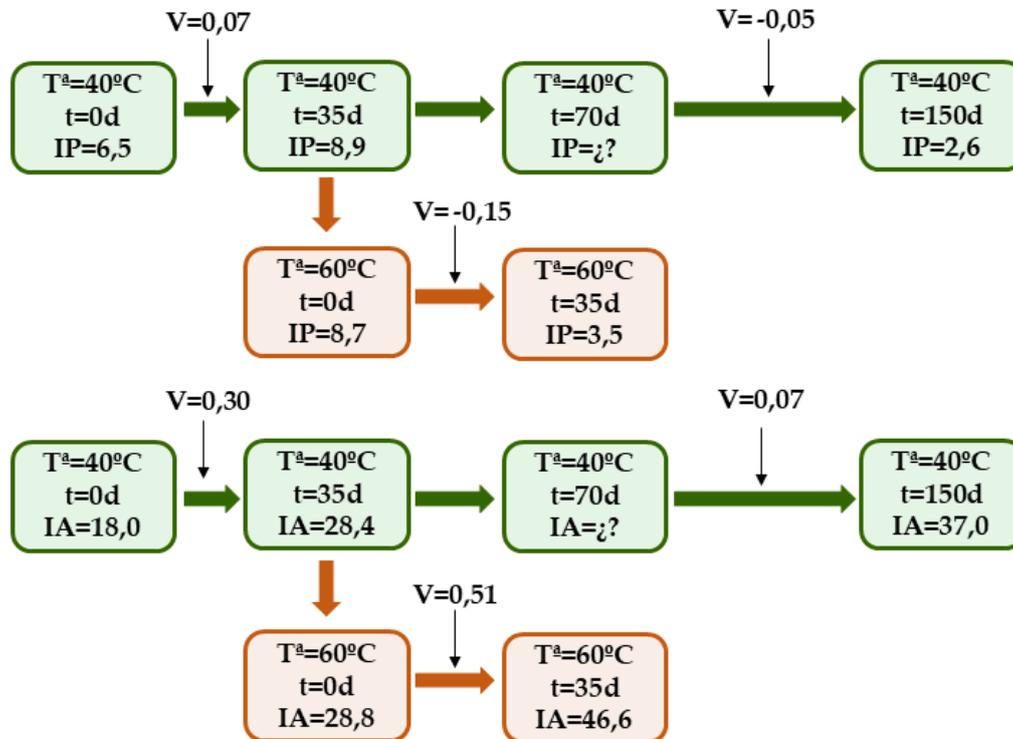
Los resultados de la evolución de los parámetros IP e IA obtenidos para el aceite control de PES en las pruebas de estabilidad a 40° y 60°C se resumen en la Tabla 4.4. Los resultados numéricos obtenidos para cada una de las muestras estudiadas pueden consultarse en el Anexo 4.4.

**Tabla 4.4.** Tabla resumen de resultados de IP e IA de muestra control de aceite de pescado en las pruebas de estabilidad en estufa a 40 y 60°C.

Índice	Estabilidad 40°C			Estabilidad 60°C	
	Tiempo (días)				
	t=0	t=35	t=150	t=0	t=35
<b>IP</b>	6,48 ±0,25	8,86 ±0,03	2,60 ±0,05	8,70 ±0,23	3,47 ±0,17
<b>IA</b>	17,96 ±0,16	28,39 ±0,13	36,98 ±0,02	28,80 ±0,16	46,62 ±1,36

Resultados expresados como media ±SD (n=3).

Al igual que en el caso de los dos aceites anteriores, con el fin de estudiar el comportamiento del aceite de pescado en cuanto a su estabilidad oxidativa en función de parámetros como t y T<sup>a</sup>, los resultados descritos en la Tabla 4.4 podrían representarse a través del esquema reflejado en la Figura 4.38 en el que se indica la relación en la evolución de los valores de los índices IP e IA del aceite control obtenidos en las distintas pruebas de estabilidad a 40° y 60°C°, así como la V de incremento de dichos índices en cada una de las etapas. Es importante considerar que el comportamiento de este aceite *vs* los procesos de oxidación es significativamente distinto al de los aceites de girasol y de uva, tal y como ya se ha descrito con anterioridad al comentar los resultados del estudio de estabilidad a largo plazo a 40°C.



**Figura 4.38.** Esquema representativo de la evolución de los índices IP e IA en la muestra control del aceite de pescado en función del tiempo (t) y la temperatura (Tª). La velocidad (V) de incremento de IP e IA en un periodo de tiempo determinado se expresa en unidades de IP ó IA/día.

En base al esquema representado en la Figura 4.38 podemos sacar las siguientes conclusiones:

- A una Tª de 40°C, dada la inestabilidad bien conocida de este tipo de aceites, se produce una primera etapa en la que los hidroperóxidos se acumulan temporalmente, con un ligero incremento del IP de 0,07 unidades IP/día. No es posible establecer con precisión hasta qué momento se acumulan estos compuestos, pues al final del periodo de 150 d, y tras los primeros 35, el valor de IP muestra un descenso promedio de -0,055 unidades IP/día.
- A una Tª de 40°C la generación de compuestos con grupos carbonilo (IA) a partir de los hidroperóxidos formados, resulta proporcionalmente intensa

en la primera etapa, con una evolución creciente de 0,30 unidades IA/día. Posteriormente, a lo largo de todo el periodo de estudio, esa velocidad disminuye, suponiendo un promedio entre los 35 y 150 días de 0,07 unidades IA/día.

- A una  $T^a$  de 60°C no se produce acumulación alguna de hidroperóxidos (IP), las condiciones de  $T^a$  catalizan de forma inmediata su conversión en compuestos carbonilo, a una velocidad de reducción de -0,15 unidades IP/día. Esto supone una aceleración en la velocidad de desaparición de hidroperóxidos de 3 veces la que se produce a 40°C.
- A una  $T^a$  de 60°C la generación de compuestos con grupos carbonilo (IA) a partir de los hidroperóxidos formados, resulta muy significativa, con un incremento promedio de 0,51 unidades IA/día, es decir, una velocidad de generación casi 7 veces superior que a 40°C.

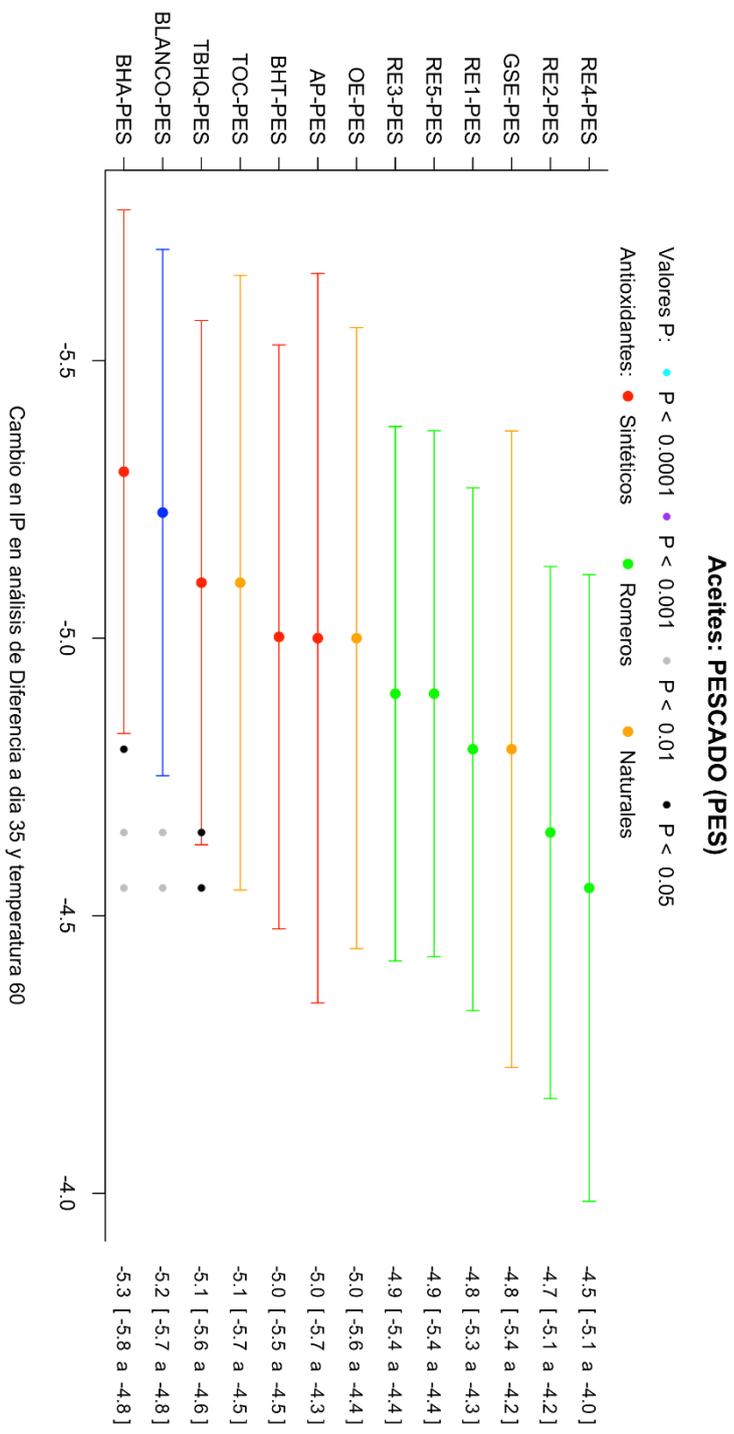
El estudio a 40°C, no nos había proporcionado conclusiones estructurales acerca de la capacidad de cada uno de los compuestos estudiados sobre el control de la formación de hidroperóxidos en este aceite de una forma tan clara como en el caso del aceite de girasol alto oleico.

En la Figura 4.39 se refleja la diferencia del valor de IP ( $\Delta_{IP}$ ) en la prueba de estabilidad a 60°C entre el día 0 y el día 35 para cada antioxidante y el control en el aceite de pescado. Al comparar los valores absolutos del incremento de IP observamos que, esta experiencia de 35 días a 60°C no muestra diferencias significativas en cuanto a la evolución de la presencia de estos compuestos en ninguna de las muestras de aceite con antioxidantes. La velocidad de "desaparición" de hidroperóxidos varía, en todos los casos, entre 0,13 y 0,15 unidades IP/día, muy similar a la del aceite control (0,15 unidades IP/día). Es decir, de forma preliminar, podríamos sugerir que, en las condiciones de este ensayo, ninguno de los antioxidantes estudiados es capaz de evitar drásticamente la generación de compuestos con grupos carbonilo, lo que hubiera supuesto, en mayor o menor grado, que continuara la acumulación de hidroperóxidos y, por tanto, el aumento del IP. Es más, la disminución en el valor de IP en todos los casos, indica una activación de las reacciones de oxidación secundarias, lo que se refleja en un incremento en IA.

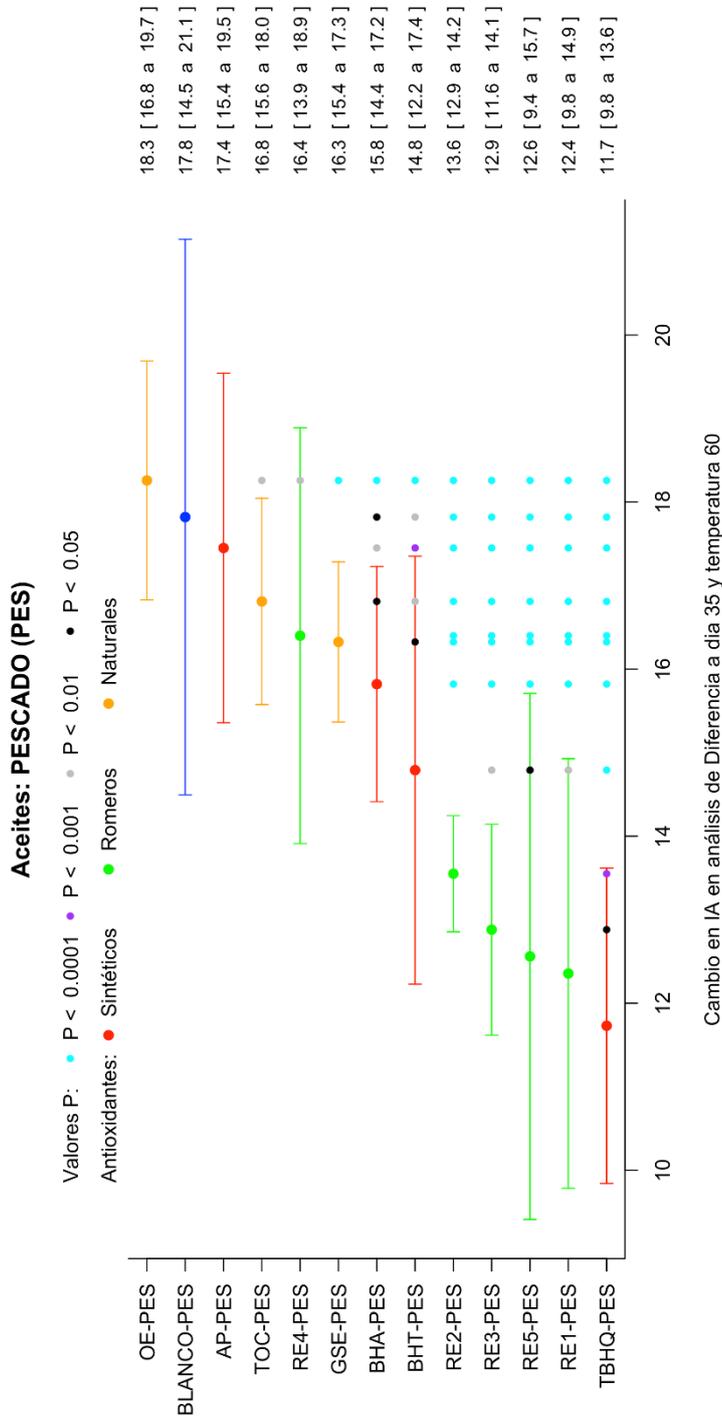
El diferente comportamiento en la evolución del índice IA ( $\Delta_{IA}$ ), en las condiciones de este ensayo, descrito en la Figura 4.40, tampoco nos sugiere diferencias entre los distintos antioxidantes en relación con su capacidad específica para reducir la velocidad de generación de compuestos carbonilo y otras reacciones posteriores de oxidación.

El comportamiento en la evolución del índice IA, en las condiciones de este ensayo, descrito en la Figura 4.36, tampoco nos sugiere diferencias estadísticamente muy significativas entre los distintos antioxidantes en relación con su capacidad específica para reducir la velocidad de generación de compuestos carbonilo y otras reacciones posteriores de oxidación.

El compuesto sintético AP, el extracto natural TOC, así como los dos extractos OE y GSE, e incluso el extracto de romero RE-4, no muestran capacidad antioxidante alguna para controlar la formación de especies carbonilo. Los sintéticos BHA y BHT (habitualmente empleados en la industria del aceite de pescado, aunque ahora cada vez menos), presentan una capacidad reducida de 10 y 15% ( $p < 0,05$  y  $p < 0,01$  respectivamente). Los extractos de romero RE1, RE2, RE3 y RE5 muestran una capacidad de reducción en torno al 25-35% ( $p < 1e-04$  para los cuatro extractos). Finalmente, el sintético TBHQ, es capaz de reducir un 35% el incremento de compuestos carbonilo característicos de esta segunda etapa de oxidación ( $p < 1e-04$ ). Con esta distribución de datos, en la que solo se observan variaciones medias con respecto al blanco, no es posible realizar alguna hipótesis estructura-actividad. Únicamente, podemos continuar considerando que, en condiciones de trabajo con temperaturas más elevadas, el sintético TBHQ muestra los mejores resultados, seguido por los extractos de romero.



**Figura 4.39.** Gráfica comparativa del efecto de los distintos antioxidantes estudiados sobre el incremento del parámetro IP entre tiempo 0 y 35 días en el aceite de pescados envejecido a 60°C. En el eje de ordenadas se muestran los antioxidantes ordenados ascendientemente en función del incremento de IP. En el eje de abscisas se representa el incremento de IP para cada antioxidante. A la derecha se describe el valor medio del incremento de IP junto con su intervalo de confianza al 95% entre paréntesis.



**Figura 4.40.** Gráfica comparativa del efecto de los distintos antioxidantes estudiados sobre el incremento del parámetro IA entre tiempo 0 y 35 días en el aceite de pescado envejecido a 60°C. En el eje de ordenadas se muestran los antioxidantes ordenados ascendientemente en función del incremento de IA. En el eje de abscisas se representa el incremento de IA para cada antioxidante. A la derecha se describe el valor medio del incremento de IA junto con su intervalo de confianza al 95% entre paréntesis.

### 4.3.3. Efecto de la relación ácido carnósico/carnosol del extracto de romero sobre su capacidad de estabilización lipídica.

#### 4.3.3.1. Aceite de girasol alto oleico

La valoración de la importancia de la relación de concentración entre los dos diterpenos del romero, CA y COL (ratio CA/COL), merece atención especial, ya que podría suponer un elemento clave en el diseño de extractos de romero más eficaces como antioxidantes lipídicos.

En la primera etapa (días 0-35) del estudio de estabilidad a 40°C del aceite de girasol alto oleico (Figura 4.3, pag. 206) observamos que los cinco extractos de romero estudiados muestran comportamientos similares en la etapa inicial, pero, a partir de los 21-28 días la evolución del valor de IP es más específica en función, sobre todo, de la ratio CA/COL.

Los extractos con una mayor fase de latencia casi completa (28 días) serían RE2 (CA/COL: 2,84) y RE5 (CA/COL: 14,66). Podríamos decir pues que, se confirma en este caso que la ratio óptima (CA/COL: 2,84) observada en el estudio de la capacidad antirradical frente a DPPH•, es igualmente la que muestra una mayor capacidad de control de la formación de hidroperóxidos. Del mismo modo, adicionalmente en este caso, la presencia mayoritaria en el extracto de CA sugiere que este compuesto es mucho más activo que COL en el control del nivel de dichos hidroperóxidos.

Los resultados de los extractos RE1 (CA/COL: 0,37), RE3 (CA/COL: 5,60) y RE4 (CA/COL: 5,34) son muy similares entre ellos también hasta los 28 días de estudio, confirmando que ratios diferentes al teóricamente óptimo, así como una presencia mayoritaria de COL en el extracto suponen una menor capacidad antioxidante en esta etapa específica.

No obstante, alcanzados los 35 días de estudio, únicamente el extracto RE5, en el que la presencia de CA como diterpeno activo es claramente mayoritaria, presenta una significativa capacidad antioxidante. Es decir, la presencia de la función ácido carboxílico en la estructura diterpénica parece resultar primordial para inhibir/captar/bloquear la cadena oxidativa generada por la generación de compuestos de tipo hidroperóxido. La formación de compuestos de oxidación

secundaria (IA) en esta primera etapa de análisis de estabilidad a 40°C es prácticamente nula por lo que no se puede observar la capacidad de los extractos de romero para retardar la aparición de estos compuestos (Figura 4.8, pag. 214).

Las mismas observaciones pueden aplicarse a los resultados obtenidos en la segunda etapa de estabilidad a 40 °C (días 0-150) ya que, solo los extractos RE2 y RE5 muestran diferencias estadísticamente significativas respecto a los demás extractos de romero en su capacidad para reducir la formación de hidroperóxidos (Figura 4.6, pag. 210). La oxidación secundaria a los 150 días (IA) sigue siendo a penas significativa, solo los extractos RE3 y RE5 muestran diferencias estadísticamente significativas respecto a los demás extractos de romero en su capacidad para reducir la formación de productos de oxidación secundaria (Figura 4.10, pag. 216).

En la experiencia de estabilidad a 60°C en el aceite de girasol alto oleico no se pueden apreciar diferencias muy significativas en la capacidad de los distintos extractos de romero para reducir el incremento de IP (Figura 4.33, pag. 259). Únicamente el RE1, en el que la presencia de COL como diterpeno activo es claramente mayoritaria, presenta menor capacidad para retardar la formación de hidroperóxidos respecto al resto de extractos de romero. Sin embargo, la formación de compuestos carbonilo (IA) en esta experiencia a una temperatura más elevada (60°C), sí es más apreciable. Los distintos extractos muestran diferencias estadísticamente significativas de distintos tamaños en cuanto a su capacidad para reducir la formación de compuestos de oxidación secundaria, pero las diferencias encontradas no permiten obtener conclusiones sobre la posible influencia de la ratio CA/COL (Figura 4.34, pag. 260).

#### *4.3.3.2. Aceite de semilla de uva*

En la primera etapa (días 0-35) del estudio de estabilidad a 40°C del aceite de semilla de uva (Figura 4.14., pag. 225) observamos que los cinco extractos de romero estudiados muestran comportamientos similares en la etapa inicial, con la mencionada fase de latencia idéntica hasta los 21 días, pero, a partir de los 21-28 días la evolución del valor de IP nos permitiría establecer sencillamente las siguientes conclusiones:

- A los 28 y 35 días, los valores de IP de los extractos muestran una tendencia inversamente proporcional al valor de la ratio CA/COL. Del mismo modo, adicionalmente en este caso, la presencia mayoritaria en el extracto de CA sugiere que este compuesto es mucho más activo que COL en el control del nivel de dichos hidroperóxidos.
- Es decir, que del mismo modo que sucedía para ácido oleico (girasol), la presencia de la función ácido carboxílico en la estructura diterpénica parece resultar primordial para inhibir/captar/bloquear la cadena oxidativa generada por la generación de compuestos de tipo hidroperóxido, mientras que la estructura lactona intramolecular disminuye dicha capacidad proporcionalmente.

Al igual que en aceite de girasol alto oleico, la formación de compuestos de oxidación secundaria (IA) en esta primera etapa de análisis de estabilidad a 40°C es prácticamente nula en el aceite de semilla de uva, por lo que no se puede observar la capacidad de los extractos de romero para retardar la aparición de estos compuestos (Figura 4.17, pag. 229).

Los resultados obtenidos en la segunda etapa de estabilidad a 40 °C (días 0-150) para el aceite de semilla de uva muestran que solo el extracto RE3 manifiesta una diferencia estadísticamente significativa respecto al resto de extractos de romero en su capacidad para frenar la formación de (Figura 4.16, pag. 227). La oxidación secundaria a los 150 días (IA) sigue siendo poco significativa, solo los extractos RE1 muestra una capacidad inferior a los demás extractos de romero para reducir la formación de productos de oxidación secundaria (Figura 4.19, pag. 231).

En la experiencia de estabilidad a 60°C en el aceite de semilla de uva no se pueden apreciar diferencias muy significativas en la capacidad de los distintos extractos de romero para reducir el incremento de IP (Figura 4.36, pag. 264). Únicamente el RE5, en el que la presencia de CA como diterpeno activo es claramente mayoritaria, presenta una mayor capacidad para retardar la formación de hidroperóxidos respecto al resto de extractos de romero estadísticamente significativa. La formación de compuestos carbonilo (IA) en esta experiencia a 60°C sí es más apreciable. Los distintos extractos muestran diferencias estadísticamente significativas de distintos tamaños en cuanto a su capacidad para reducir la

formación de compuestos de oxidación secundaria, pero, al igual que sucede en el aceite de girasol alto oleico, las diferencias encontradas no permiten obtener conclusiones muy relevantes sobre la posible influencia de la ratio CA/COL (Figura 4.37, pag. 265).

#### *4.3.3.3. Aceite de pescado*

En la primera etapa (días 0-35) del estudio de estabilidad a 40°C del aceite de pescado (Figura 4.23, pag. 240) observamos que los cinco extractos de romero estudiados muestran un comportamiento muy similar caracterizado por un incremento en el valor de IP durante la primera semana de estudio hasta los 7 días, seguido una tendencia oscilante de carácter sinusoidal que varía para los distintos antioxidantes. Este comportamiento dificulta la realización de una comparativa de tendencias fiable. Solo es de destacar la actividad del extracto RE4 respecto al resto de extractos. A diferencia de los dos aceites estudiados anteriormente, la formación de compuestos de oxidación secundaria (IA) en esta primera etapa de análisis en el aceite de pescado es intensa (Figura 4.26, pag. 245). Entre los extractos de romero, no se encuentran diferencias estadísticamente significativas en cuanto a su capacidad para reducir la velocidad de formación de estos compuestos carbonilo, por lo que no se pueden sacar conclusiones sobre la posible influencia de la ratio CA/COL sobre su actividad antioxidante.

Los resultados obtenidos en la segunda etapa de estabilidad a 40°C (días 0-150) reflejan una disminución notable del valor de IP debido a la descomposición de hidroperóxidos (Figura 4.25, pag. 242). Este comportamiento no permite establecer conclusiones respecto a la posible relación de la ratio CA/COL sobre la capacidad de los extractos de romero para retardar la formación de hidroperóxidos. La descomposición de estos productos de oxidación primaria se ve reflejada en el consecuente incremento del valor IA. Aunque todos los extractos de romero disminuyen la acumulación de compuestos carbonilo y muestran diferencias estadísticamente significativas de distintos tamaños entre ellos (Figura 4.28, pag. 247), las diferencias encontradas no permiten obtener conclusiones relevantes sobre la posible influencia de la ratio CA/COL.

En la experiencia de estabilidad a 60°C en el aceite de pescado se observa de nuevo una disminución en el valor de IP para todas las muestras, incluidos los

cinco extractos de romero estudiados (Figura 4.39, pag. 270). La descomposición de los hidroperóxidos se refleja también en una acumulación de compuestos carbonilo (Figura 4.40, pag. 271). La actividad de los extractos de romero para reducir el incremento de IA es similar en todos ellos, salvo en el caso de RE4 que presenta menor capacidad antioxidante en este análisis, mostrando diferencias estadísticamente significativas respecto al resto de extractos de romero.

#### *4.3.3.4. Consideraciones generales*

En función de las consideraciones previamente descritas para cada aceite en cuanto al comportamiento de los distintos extractos de romero en función de su ratio CA/COL, podemos abordar la construcción de una tabla resumen que nos permita tener una visión comparativa global de este concepto en las distintas condiciones estudiadas.

**Tabla 4.5.** Resumen comparativo de la influencia de la ratio ácido carnósico/carnosol sobre el efecto antioxidante de los extractos de romero en la prueba de estabilidad en estufa a 40 y 60°C.

IP/IA /TTX	t/T <sup>a</sup>	Aceite de girasol alto oleico	Aceite de semilla de uva	Aceite de pescado
IP	35d 40°C	A mayor CA/COL más eficacia: CA/COL>6.	A mayor CA/COL más eficacia: CA/COL>6.	Aparente campana de Gauss con máximo a [5,0-5,5].
	150d 40°C	A mayor CA/COL más eficacia: CA/COL>6. Campana de Gauss negativa para actividad en el rango [3-6].	No son posibles conclusiones.	Aparente campana de Gauss con máximo a [5,0-5,5].
	35d 60°C	No influye en la actividad.	A mayor CA/COL más eficacia: evolución lineal muy poco significativa.	Aparente campana de Gauss con mínimo a [5,0-5,5].
IA	35d 40°C	A mayor CA/COL más eficacia: evolución lineal poco significativa.	No influye en la actividad.	No son posibles conclusiones.
	150d 40°C	A mayor CA/COL más eficacia: rango de variación no significativo.	No influye en la actividad. CA/COL<1 disminuye la eficacia.	No son posibles conclusiones.
	35d 60°C	No son posibles conclusiones.	No son posibles conclusiones.	No son posibles conclusiones.
TTX	35d 40°C	A mayor CA/COL más eficacia: CA/COL>6.	No son posibles conclusiones.	Aparente campana de Gauss con máximo a [5,0-5,5].
	150d 40°C	A mayor CA/COL más eficacia: CA/COL>6. Campana de Gauss negativa para actividad en el rango [3-6].	No son posibles conclusiones.	No son posibles conclusiones.

Índice de Peróxidos (IP), Índice Anisidina (IA), valor Totox (TTX), tiempo (t), temperatura (T<sup>a</sup>).

#### 4.4. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este capítulo concluyen que:

1. En el aceite de girasol alto oleico almacenado a 40°C a corto y medio plazo, los extractos de romero (especialmente el RE5), el TBHQ y el AP son los antioxidantes más eficaces protegiendo frente a los productos de oxidación primarios. Otros antioxidantes naturales y los antioxidantes sintéticos muestran menor eficacia antioxidante medida como IP. Estas condiciones de almacenamiento no promueven la formación de productos de oxidación secundaria en cantidades muy significativas a corto plazo para poder valorar el efecto de los diferentes antioxidantes sobre ellos (IA). A medio plazo, se empieza a observar un aumento en los valores de IA, ligeramente inhibido por AP, BHT, TOC y RE3. El escaso incremento de IA, conlleva a que la capacidad de protección total (Totox) coincida con la eficacia antioxidante medida como IP. En estas condiciones, no es posible establecer de forma suficientemente sólida una relación estructura-actividad antioxidante vs hidroperóxidos de ácidos grasos n-6 en las condiciones del estudio. Las consideraciones principales desde el punto de vista estructural, en relación con la capacidad de protección del GIR en las condiciones indicadas, serían: la presencia simultánea de la estructura  $-O-[C=O]-$  (estructura éster-ácido carboxílico) y la presencia de un grupo catecol o de una estructura tipo orto-dihidroxi.
2. En el aceite de semilla de uva almacenado a 40°C a corto plazo, el TBHQ, RE5 y AP son los antioxidantes más eficaces protegiendo frente a los productos de oxidación primarios, y el TBHQ seguido de GSE, RE3 y AP a medio plazo. Otros antioxidantes naturales y sintéticos muestran menor eficacia medida como IP. Estas condiciones de almacenamiento no promueven la formación de productos secundarios de oxidación en cantidades significativas para poder valorar el efecto de los diferentes antioxidantes sobre ellos (IA), por lo que la capacidad de protección total (Totox) coincide con la eficacia antioxidante medida como IP. En estas condiciones, no ha sido posible establecer de forma suficientemente sólida

una relación estructura-actividad antioxidante vs hidroperóxidos de ácidos grasos n-6 en las condiciones del estudio.

3. En el aceite de pescado almacenado a 40°C a corto plazo, los productos primarios de oxidación disminuyen en mayor grado con el uso de RE4, RE5, BHT y GSE mostrando el TBHQ una escasa actividad antioxidante en esta matriz alimentaria. A medio plazo, estos productos de oxidación primarios formados van desapareciendo en el tiempo al transformarse en productos de oxidación secundarios, por lo que con los datos obtenidos para el parámetro IP, no es posible establecer de forma suficientemente sólida una relación estructura-actividad antioxidante vs hidroperóxidos de ácidos grasos omega-3 en las condiciones del estudio. No se aprecia en ninguno de los compuestos antioxidantes ensayados capacidad antioxidante frente a los productos secundarios de oxidación en el aceite de pescado almacenado a corto plazo a 40°C. Sin embargo, a medio plazo, aunque todos los antioxidantes muestran actividad, los extractos naturales TOC y GSE ponen de manifiesto el mayor poder antioxidante frente a estos productos de oxidación secundaria, seguidos de RE3 y RE4, siendo TBHQ y BHT muy poco eficaces en estas condiciones. Los datos obtenidos en esta fase de estudio para el valor Totox en el aceite de pescado no son representativos de la oxidación total.
4. Cuando el aceite de girasol alto oleico se almacena a 60°C a corto plazo, solo cuatro extractos de romero (RE3, RE5, RE2 y RE4) muestran capacidad antioxidante frente a los productos de oxidación primarios (IP). Sin embargo, para disminuir la formación de los productos secundarios de oxidación, los antioxidantes más eficaces son TBHQ y RE3. Los antioxidantes naturales (TOC, GSE y OE) no muestran actividad para controlar la formación de especies carbonilo.
5. En el aceite de semilla de uva almacenado a 60°C a corto plazo, solo el RE5 disminuye significativamente los productos de oxidación primarios (IP), mientras que los antioxidantes que muestran una mayor disminución

significativa de los productos de oxidación secundarios son BHA, GSE y RE3. Con esta distribución de datos no es posible realizar alguna hipótesis sobre la relación estructura-actividad antioxidante.

6. El aceite de pescado almacenado a 60°C a corto plazo muestra un pronunciado incremento de productos de oxidación secundarios, procedente de la descomposición de hidroperóxidos, lo que se cuantifica como una disminución, en los valores del IP y un incremento del IA a lo largo del tiempo. Dentro de los antioxidantes ensayados, el que más reduce el incremento de compuestos carbonilo característicos de esta segunda etapa de oxidación es el TBHQ, seguido de los extractos de romero (RE1, RE2, RE3 y RE5). El resto de los antioxidantes naturales ensayados (RE4, TOC, GSE y OE) no muestran ninguna capacidad para disminuir el IA. Esta distribución en los datos no permite realizar ningún tipo de análisis de relación estructura-actividad antioxidante.
7. En los aceites de girasol alto oleico y de semilla de uva, almacenados a 40°C y 60°C, el mayor contenido en CA se relaciona con una mayor actividad antioxidante respecto al COL sobre la disminución de formación de productos de oxidación primarios, pero no en el efecto sobre la formación de productos secundarios de oxidación. No se puede definir en estas condiciones una ratio CA/COL óptima para desarrollar la capacidad antioxidante. Sin embargo, en la matriz alimentaria aceite de pescado, los resultados son muy diferentes ya que durante el almacenamiento de este aceite a 40°C se aprecia que una ratio CA/COL en el entorno de 5,0-5,5-6 muestra una cierta sinergia antioxidante respecto a la disminución de productos de oxidación primaria y secundaria.

**Capítulo 5: Determinación de Capacidad  
Antilipoperoxidante frente a Oxidación  
Acelerada: Rancimat.**



## **CAPÍTULO 5: DETERMINACIÓN DE CAPACIDAD ANTILIPOPEROXIDANTE FRENTE A OXIDACIÓN ACELERADA: RANCIMAT.**

### **5.1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS**

La estabilidad oxidativa (OSI por sus iniciales en inglés: Oil stability Index) es uno de los parámetros de calidad más importantes de los aceites vegetales y grasas comestibles, ya que determina su utilidad tanto en procesos tecnológicos, como en su vida útil, es decir, el tiempo de conservación, la palatabilidad, la calidad nutricional y la toxicidad de los aceites y grasas. La determinación del periodo de inducción, que representa el tiempo necesario para alcanzar el punto de partida de la oxidación de los lípidos, es la forma de medir dicha estabilidad oxidativa, de manera que, un periodo de inducción más largo puede asociarse con una mayor estabilidad frente a la oxidación de un aceite o grasa.

La medición de la estabilidad oxidativa suele ser una tarea difícil ya que la oxidación a temperatura ambiente o a bajas temperaturas es un proceso lento. El ensayo más fiable y realista es el almacenamiento de los aceites junto con la determinación periódica del índice de peróxidos (IP) y el índice de *p*-anisidina (IA), ambos indicadores de la presencia de productos de oxidación primaria y secundaria respectivamente. La gran desventaja que presenta esta práctica es que requiere de demasiado tiempo. Debido a que el tiempo es crucial en la industria alimentaria, es deseable medir la estabilidad del aceite rápidamente durante la producción y antes del envío de los productos para su distribución. Esto se logra, generalmente, empleando condiciones de temperatura que aceleren el proceso de oxidación.

Se han reportado varias pruebas químicas y métodos acelerados para la determinación de la estabilidad oxidativa de aceites y grasas (Gordon & Mursi, 1994; Isbell, Abbott, & Carlson, 1999). Tradicionalmente se ha utilizado el método del oxígeno activo (AOM) para tales determinaciones. Pero este método resulta tedioso e irreproducible, además, implica el uso de productos químicos tóxicos y

una valoración laboriosa, lo que ha llevado a buscar métodos más efectivos y rentables para la práctica industrial.

El método Rancimat ha sido desarrollado como variante automatizada del costoso método AOM para determinar el periodo de inducción de grasas y aceites. La capacidad de este método para determinar la estabilidad oxidativa de los aceites en un periodo de tiempo muy corto, junto con la automaticidad y repetibilidad de la determinación analítica, lo ha convertido en una herramienta fundamental en la valoración tecnológica de aceites y grasas y, con el transcurso del tiempo, se ha establecido y hecho su entrada en normativas nacionales e internacionales como AOCS Cd 12b-92 (AOCS, 1997).

Este método permite también evaluar y optimizar las estrategias de estabilización de las matrices lipídicas mediante la aplicación de sustancias antioxidantes.

En relación con las tres matrices alimentarias empleadas (aceite de girasol alto oleico, aceite de semilla de uva y aceite de pescado) y los doce compuestos antioxidantes estudiados en esta memoria, los objetivos de este capítulo fueron los siguientes:

- Cuantificar la capacidad estabilizadora frente a la oxidación lipídica.
- Comparar la capacidad estabilizadora de cada antioxidante sobre las tres matrices alimentarias estudiadas, con el fin de observar si existe mayor o menor afinidad por una naturaleza lipídica concreta: n-9 (mayoritario en el aceite de girasol alto oleico), n-6 (mayoritario en el aceite de semilla de uva) y n-3 (mayoritario en el aceite de pescado).
- Comparar la capacidad estabilizadora de los distintos extractos de romero sobre las tres matrices alimentarias estudiadas, con el fin de evaluar cómo puede influir la relación entre las concentraciones de ácido carnósico y carnosol sobre la capacidad de cada extracto para retardar su en función de cada naturaleza lipídica.

## 5.2. MATERIAL Y MÉTODOS

### 5.2.1. Material

#### 5.2.1.1. Reactivos

- Agua destilada (Destilador de agua ultrapura Millipore Elix 3UV. Vent Filter MPK01).
- Acetona (N° CAS: 67-64-1; N° CE: 200-662-2; N° REACH: 01-2119471330-49-0016) CEPSA Química (Madrid, España).
- Etanol de grado alimentario del 94-96%. Azucarera montero (Granada, España).

#### 5.2.1.2. Antioxidantes

Las sustancias antioxidantes empleadas para estudiar su efecto sobre la resistencia de las matrices lipídicas a la oxidación acelerada mediante el método Rancimat, se describen a continuación organizados en tres grupos:

1. Grupo de antioxidantes sintéticos (SIN), que incluye:
  - Butilhidroxianisol (BHA).
  - Butilhidroxitolueno (BHT).
  - Terc-butilhidroquinona (TBHQ).
  - Palmitato de ascorbilo (PA).
2. Grupo de extractos de romero (ROM), que incluye:
  - Extracto de romero 1 (RE1).
  - Extracto de romero 2 (RE2)
  - Extracto de romero 3 (RE3)
  - Extracto de romero 4 (RE4)
  - Extracto de romero 5 (RE5)

3. Grupo de otros antioxidantes naturales (NAT), que incluye:
  - Extracto natural de tocoferoles (TOC)
  - Extracto de Oliva (EO)
  - Extracto de semilla de uva (GSE)

Tanto la caracterización como la procedencia de los antioxidantes y extractos comerciales incluidos en este capítulo, así como los procesos de extracción y cuantificación cromatográfica de principios activos antioxidantes (PAA) en el caso de los extractos vegetales, se describen con detalle en el capítulo 1.

#### *5.2.1.3. Matrices alimentarias*

Las matrices lipídicas empleadas para estudiar su resistencia a la oxidación acelerada en estufa a temperaturas de 40 y 60°C, fueron las siguientes:

- Aceite de girasol alto oleico (GIR)
- Aceite de semilla de uva (SEM)
- Aceite de pescado (PES)

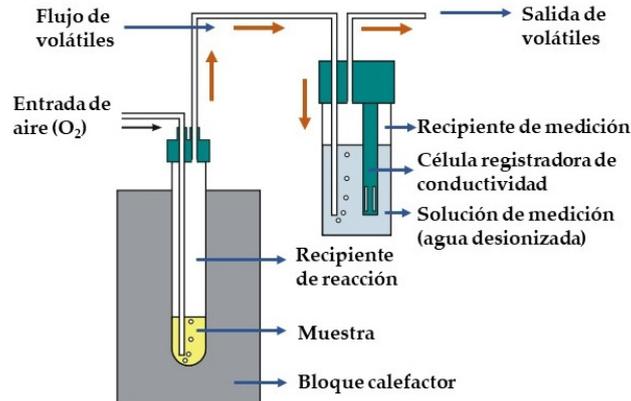
Tanto la caracterización lipídica como la procedencia de estos tres aceites se describen con detalle en el capítulo 3.

### **5.2.2. Método**

#### *5.2.2.1. Fundamento*

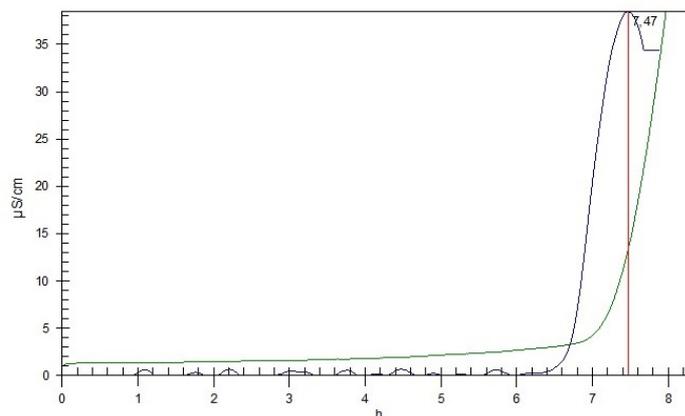
El método denominado Rancimat determina la resistencia a la oxidación de un aceite al pasar una corriente de aire purificado a través de una muestra de aceite mantenida a una temperatura constante. El aire efluente de la muestra de aceite o grasa se hace burbujear a través de un recipiente que contiene agua desionizada. La conductividad del agua se controla continuamente y cambia cuando los ácidos orgánicos volátiles creados por la oxidación del aceite (en su mayor parte ácidos fórmicos) se disuelven en el agua (ver Figura 5.1). Mediante el registro continuo de la conductividad de esta solución en función del tiempo se consiguen curvas de

oxidación cuyo punto de inflexión se denomina tiempo de inducción (TI) y representa una buena magnitud característica para medir la estabilidad a la oxidación de una muestra («Manual 743 Rancimat», s. f.).



**Figura 5.1.** Representación del fundamento del método Rancimat. Imagen modificada. Fuente imagen: Manual 743 Rancimat («Manual 743 Rancimat», s. f.)

El equipo determina automáticamente el TI empleando la segunda derivación de la curva registrada que muestra un máximo en el punto de inflexión (ver Figura 5.2). El valor del TI indica la resistencia del aceite a la oxidación de manera que, un mayor TI indica que esa muestra es más estable.



**Figura 5.2.** Ejemplo de grafica conductividad/tiempo con el cálculo del Tiempo de Inducción (TI) obtenida con el método Rancimat.

El ensayo Rancimat se empleó para evaluar la capacidad que posee cada uno de los antioxidantes analizados para incrementar la estabilidad oxidativa de los aceites de nuestro estudio. Comparando el TI del aceite sin antioxidante añadido (blanco) con el TI del mismo aceite con un antioxidante aplicado, podemos calcular el factor de estabilización (FE) de dicha sustancia sobre ese aceite. Se puede comparar la eficacia de distintos antioxidantes mediante la comparación de sus respectivos FE.

#### *5.2.2.2. Procedimiento*

Para el presente estudio, se realizó la determinación de la estabilidad oxidativa de cada uno de los aceites en presencia de cada uno de los distintos antioxidantes objeto de nuestro estudio a tres concentraciones distintas de PAA (50, 100 y 200 ppm), empleando el equipo Rancimat 743 (Metrohm).

Al tratarse de aceites puros, nuestras muestras no necesitaron acondicionamiento previo, solo la disolución de los antioxidantes en los distintos aceites. Para ello se preparó una disolución madre de aceite con una concentración de 1000 ppm de PAA, pesando la cantidad de antioxidante bruto necesaria en función de su concentración de PAA. Esta disolución madre se sometió a agitación magnética sellada con Parafilm durante 30 min y después se dejó reposar otros 30 min. A partir de esta disolución se prepararon el resto de las diluciones a las distintas concentraciones de PAA ya descritas.

Se pesaron en los recipientes de reacción 3 g de aceite a cada una de las concentraciones de antioxidante preparadas. Se pesaron también 3 g del mismo aceite sin antioxidante añadido (blanco). Todas estas pesadas se realizaron por duplicado. En la Figura 5.3 se muestra un ejemplo de la distribución de los recipientes de reacción con las muestras a distintas concentraciones.

Los recipientes de medición se prepararon rellenando cada uno de ellos con 60 mL de agua destilada. Una vez preparados los recipientes de reacción con las muestras y los recipientes de medición se taparon con sus respectivas tapas y se colocaron en el equipo Rancimat 743. (Ver Figura 5.4)

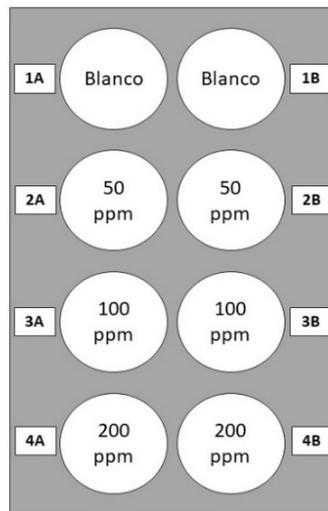


Figura 5.3. Ejemplo de distribución de las muestras en el ensayo Rancimat.

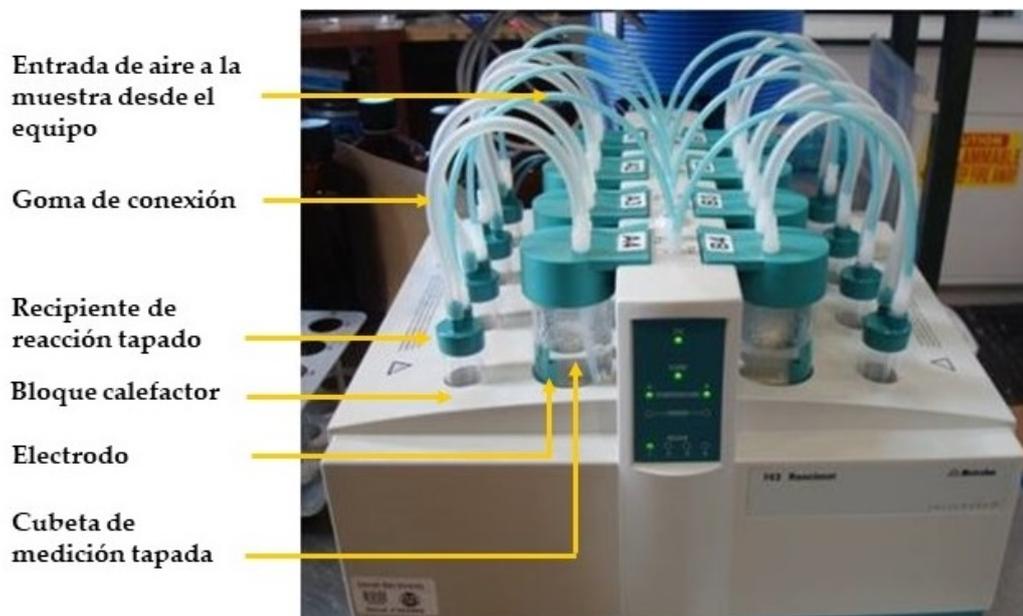


Figura 5.4. Equipo Rancimat montado y preparado para la determinación.

Se seleccionó un método de medida específicamente diseñado para cada uno de los aceites estudiados (ver parámetros de medición de los métodos en Tabla 3.1.).

La temperatura para la determinación de la estabilidad se seleccionó, siguiendo indicaciones del fabricante (Metrohm), en función de la naturaleza del aceite a analizar, con el fin de que la determinación se lleve a cabo en un número de horas ni demasiado corto, pues perdería precisión, ni demasiado largo, ya que se demoraría en exceso la obtención del resultado, resultando antieconómico y pudiendo ocasionar problemas por evaporación del agua del recipiente de medida. El fabricante recomienda, como orientación, la obtención de resultados comprendidos entre 3 y 12 horas.

El valor de Delta T es la corrección de temperatura e indica la magnitud por la que la temperatura del bloque calefactor debe ser incrementada para que la muestra alcance la temperatura de determinación establecida. Este valor se determinó midiendo la divergencia entre la temperatura del bloque (indicada por el equipo) y la temperatura de la muestra (termómetro TEMP 70 para sondas PT100).

**Tabla 5.1.** Parámetros de determinación de Rancimat

Aceite	Temperatura	Delta T	Flujo de gas
Aceite Girasol	120 °C	1,6 °C	20 L/h
Aceite Semilla Uva	110 °C	1,5 °C	20 L/h
Aceite Pescado	75 °C	1,1 °C	20 L/h

Una vez alcanzada la temperatura preseleccionada, se inició la medida de estabilidad. La determinación se paralizó automáticamente al alcanzarse los criterios de paro definidos en el método (cálculo conforme a la norma AOCS Cd 12b-92).

Para cada aceite estudiado se realizaron 2 ensayos con cada uno de los antioxidantes considerados en este trabajo.

### 5.2.2.3. Expresión de resultados

El TI fue calculado automáticamente por el equipo Rancimat para cada concentración de antioxidante medida. EL FE en cada caso fue calculado empleando la siguiente fórmula:

$$FE_C = \frac{TI_C}{TI_{BL}}$$

Siendo:

FE<sub>C</sub>: factor de estabilidad para una concentración "C" determinada

TI<sub>C</sub>: tiempo de inducción del aceite a la concentración concreta del cálculo.

TI<sub>BL</sub>: tiempo de inducción del blanco.

Para cada concentración de antioxidante se expresó el FE como incremento porcentual del tiempo sobre el tiempo de referencia con concentración=0 (Blanco). Esto es una sencilla transformación: 100\*(FE-1). Esta es la variable dependiente que usaremos en los gráficos y las regresiones.

### 5.2.2.4. Limpieza del equipo

La limpieza rigurosa del equipo y de los accesorios es un punto crítico para conseguir resultados fiables y reproducibles ya que cualquier mínima contaminación pueden acelerar catalíticamente las reacciones de oxidación generar errores en los resultados (Hasenhuettl & Wan, 1992; «Manual 743 Rancimat», s. f.).

Los recipientes de reacción junto con sus tapas, las tapas de los recipientes de medición junto con el electrodo y las mangueras de entrada de aire y las mangueras de empalme entre los recipientes de reacción y de medición fueron lavados antes de cada ensayo con detergente desincrustante de laboratorio y posteriormente muy bien enjuagados con agua y acetona. Los recipientes de medición no fueron tratados con acetona porque se degradan, en este caso la acetona fue sustituida por etanol. Una vez que fueron minuciosamente lavadas todas las piezas, se secaron en estufa a 50°C.

### 5.2.3. Método de análisis estadístico

Se realizó un análisis de la importancia relativa de cada factor experimental (aceite, antioxidante, concentración, día y columna) en la variabilidad del tiempo de inducción mediante descomposición de la varianza y análisis del coeficiente  $R^2$ . El factor columna mostró una importancia despreciable ( $R^2 = 0.009\%$ ), con lo cual se decidió obviarlo tomando la media de las dos columnas en cada experimento.

Para cada combinación experimental de aceite, antioxidante y día, se calculó el factor de estabilidad (FE) a cada concentración de antioxidante: FE = ratio del tiempo de inducción de cada concentración sobre el tiempo de inducción a concentración 0. Este parámetro, junto con el cambio porcentual en el tiempo de inducción (FE - 1) fueron los parámetros empleados para realizar los análisis comparativos.

Se ajustaron modelos de regresión lineal para estudiar el incremento de tiempo de inducción al aumentar la concentración de antioxidante. Para cada combinación de aceite y antioxidante ese estimó el incremento medio porcentual del tiempo de inducción (con un intervalo de confianza del 95%), por cada incremento de 50ppm de concentración de antioxidante.

Se compararon estos incrementos porcentuales de tiempo de inducción entre distintos antioxidantes con pruebas t-Student no penalizadas y se presentó el nivel de significación.

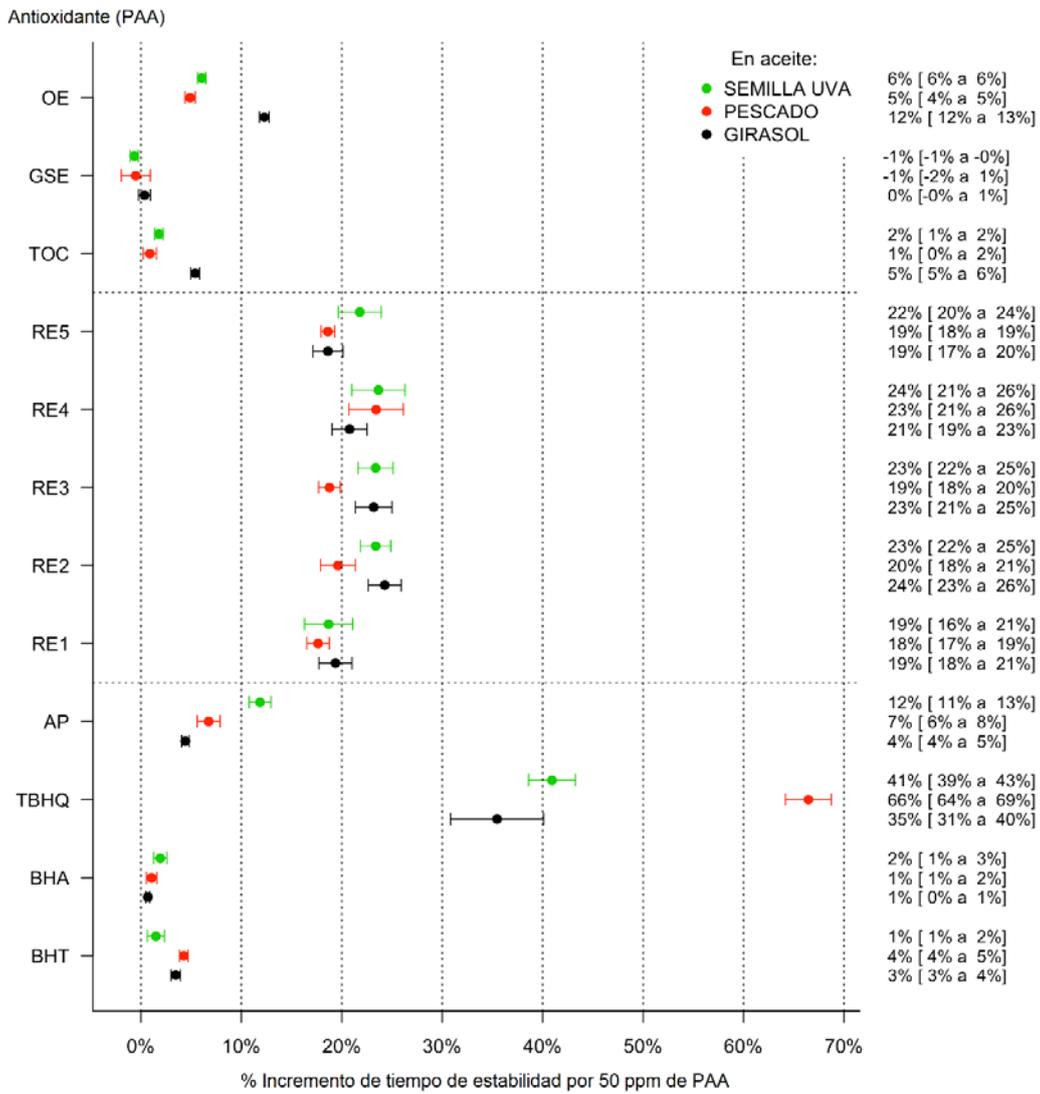
### 5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 5.3.1. Análisis de pendientes

Este primer apartado pretende ser una introducción explicativa sobre cómo se han descrito, comparado y representado gráficamente en los sucesivos apartados los resultados obtenidos en este capítulo.

A través de los ensayos llevados a cabo mediante el método Rancimat, se obtuvieron los datos de tiempo de inducción (TI) de cada matriz lipídica en función de cada antioxidante estudiado y de su concentración de aplicación; estos datos se exponen en Tablas para cada aceite estudiado en los apartados sucesivos. Comparando el TI del aceite sin antioxidante añadido (blanco) con el TI del mismo aceite con un antioxidante aplicado, podemos calcular el factor de estabilización (FE) de dicha sustancia sobre ese aceite, según se define en el apartado de expresión de resultados del presente capítulo (apartado 5.2.2.3.).

Los valores de FE obtenidos nos permitieron describir la evolución del efecto estabilizador de cada antioxidante sobre cada matriz alimentaria en función de la concentración de PAA mediante gráficas que reflejan el incremento porcentual de tiempo sobre el tiempo de estabilidad de la referencia (Blanco), para cada concentración de antioxidante. El dato porcentual se obtuvo a partir de cada FE ( $100 \cdot (FE - 1)$ ). Estas gráficas descriptivas de la evolución de FE se exponen en este capítulo en los apartados sucesivos (Figuras 5.6, 5.8 y 5.10 del apartado 5.3.1). A partir de estas gráficas, para cada antioxidante y aceite, se estimó la recta de regresión lineal del incremento porcentual del tiempo sobre la concentración de antioxidante, forzándose a que la recta pasase por el punto  $x=0, y=0$  (lo que significa que a concentración 0 no hay incremento en el tiempo de estabilidad o TI). La pendiente de esta recta refleja el incremento en % de tiempo de estabilidad por cada unidad extra de concentración de PAA. Para que fuese más legible lo multiplicamos por 50, y representamos el incremento de tiempo de estabilidad por el incremento de 50 ppm de PAA (Figura 5.5).



**Figura 5.5.** Efecto de cada antioxidante sobre el incremento del tiempo de estabilidad de cada matriz alimentaria. El eje de ordenadas refleja cada uno de los antioxidantes estudiados; en el eje de abscisas se representa el efecto como % de incremento de tiempo de estabilidad por cada 50 ppm de principio activo antioxidante; la columna de la derecha describe el valor medio del efecto junto con su intervalo de confianza al 95% entre paréntesis.

Esta figura (Figura 5.5) ofrece una primera aproximación descriptiva del efecto de cada antioxidante analizado sobre la resistencia a la oxidación de cada naturaleza lipídica presente en las matrices alimentarias estudiadas mediante el método Rancimat. Si bien esta figura nos da una visión global de los resultados obtenidos en este capítulo, en los sucesivos apartados se desarrollará y analizará, más específicamente, con el fin de, primeramente, conocer la eficacia comparativa de los distintos antioxidantes estudiados dentro de cada aceite (resultados descritos en el apartado 5.3.2); en segundo lugar, conocer las posibles diferencias de eficacia de cada antioxidante en función de la naturaleza lipídica de la matriz alimentaria que se pretendía estabilizar (resultados descritos en el apartado 5.3.3) y, por último, estudiar el posible efecto de la ratio CA/COL sobre la eficacia de los distintos RE para retardar la oxidación lipídica (resultados descritos en el apartado 5.3.4).

Para realizar el análisis estadístico comparativo de los efectos antioxidantes sobre los distintos aceites se emplearon las pendientes de las rectas obtenidas por regresión lineal del incremento porcentual del tiempo sobre la concentración de antioxidante. Debido al gran volumen de variables que analizamos (12 antioxidantes y 3 matrices lipídicas distintas) y a las múltiples comparaciones posibles entre sus efectos, los resultados de estos análisis fueron representados gráficamente con el fin de facilitar su descripción. Para ello, construimos el tipo gráfica que a continuación se describe y que servirá de herramienta para discusión estadística de los resultados de este capítulo, expuestos en las Figuras 5.7, 5.9, 5.11, 5.12, 5.13 y 5.14 (para cuya lectura e interpretación se exponen a continuación unas pautas).

**Gráficas de análisis comparativo de las pendientes de las rectas obtenidas a partir de la gráfica de evolución del incremento porcentual del tiempo sobre la concentración de antioxidante para cada sustancia analizada.** El objetivo en esta gráfica es comparar los efectos (pendientes) entre los distintos antioxidantes, así como valorar el orden de efectividad de las sustancias en cada uno de los aceites. En este tipo de gráfica, en la columna de la izquierda se ordenaron los antioxidantes por el tamaño del efecto en orden ascendente. En el eje de abscisas se representaron los efectos de los distintos antioxidantes expresados como % de incremento de tiempo por cada 50 ppm de concentración, y fueron coloreados de acuerdo con el grupo de antioxidantes al que pertenecen: sintéticos, romeros u otros naturales. En

la columna de la derecha se describió el valor medio del efecto, junto con su intervalo de confianza al 95% entre paréntesis. Incluimos en el gráfico mediante una leyenda el p-valor obtenido al comparar cada antioxidante con el resto del siguiente modo:

- Empezamos a leer el gráfico por el antioxidante con menor efecto (primera fila desde abajo en el gráfico). Realizamos un test con cada uno de los once antioxidantes que tienen mayor efecto que él para ver si el efecto del primer antioxidante es estadísticamente diferente al resto de antioxidantes. De cada uno de esos test se obtuvo un p-valor y para cada  $p < 0,05$  pusimos un punto de un color determinado en la fila del primer antioxidante, justo debajo del efecto del antioxidante con el que lo comparamos. Coloreamos el punto con distintos colores que indican diferentes tamaños del p-valor, es decir, distintos tamaños de evidencia estadística. De este modo, como máximo habrá once puntos a lo largo de la primera fila (en el caso de que el primer antioxidante muestre diferencias estadísticamente significativas con los once antioxidantes restantes). La ausencia de punto indica que la diferencia de efectos no fue estadísticamente significativa.
- Del mismo modo pasamos a leer los resultados del siguiente antioxidante con menor actividad (segunda fila del gráfico empezando por abajo) y realizamos la misma operación comparando con los diez antioxidantes que presentaron mayor efecto que él, es decir, los diez que quedan por encima de él en el gráfico. No será necesario comparar con los antioxidantes de menor efecto (los que quedan por debajo de él en el gráfico) porque ya lo habremos hecho previamente en las filas de abajo.
- De este modo, finalmente obtuvimos un área llena de puntos por debajo de los efectos de los antioxidantes. Leyendo la fila y la columna de cada punto es posible reconocer los antioxidantes donde tenemos evidencia estadística de que sus efectos son distintos.

### 5.3.2. Efecto de los antioxidantes sobre la estabilidad oxidativa de las matrices alimentarias.

#### 5.3.2.1. Aceite de Girasol Alto Oleico

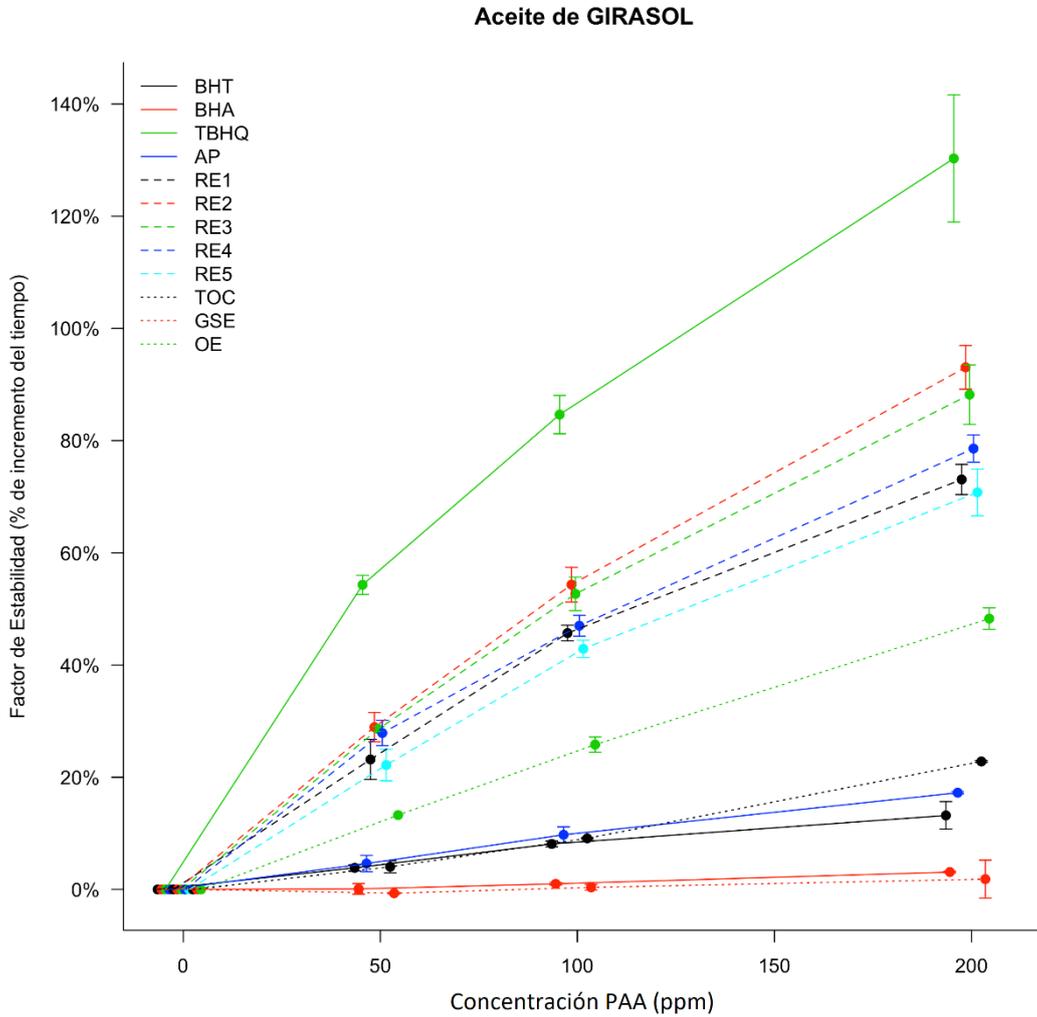
Los resultados de los TI de GIR a 120° C obtenidos tras la aplicación de cada uno de los antioxidantes estudiados a las distintas concentraciones seleccionadas (0, 50, 100 y 200 ppm de PAA) se muestran en la Tabla 5.2.

**Tabla 5.2.** Efecto de los distintos antioxidantes sobre el tiempo de inducción del aceite de girasol.

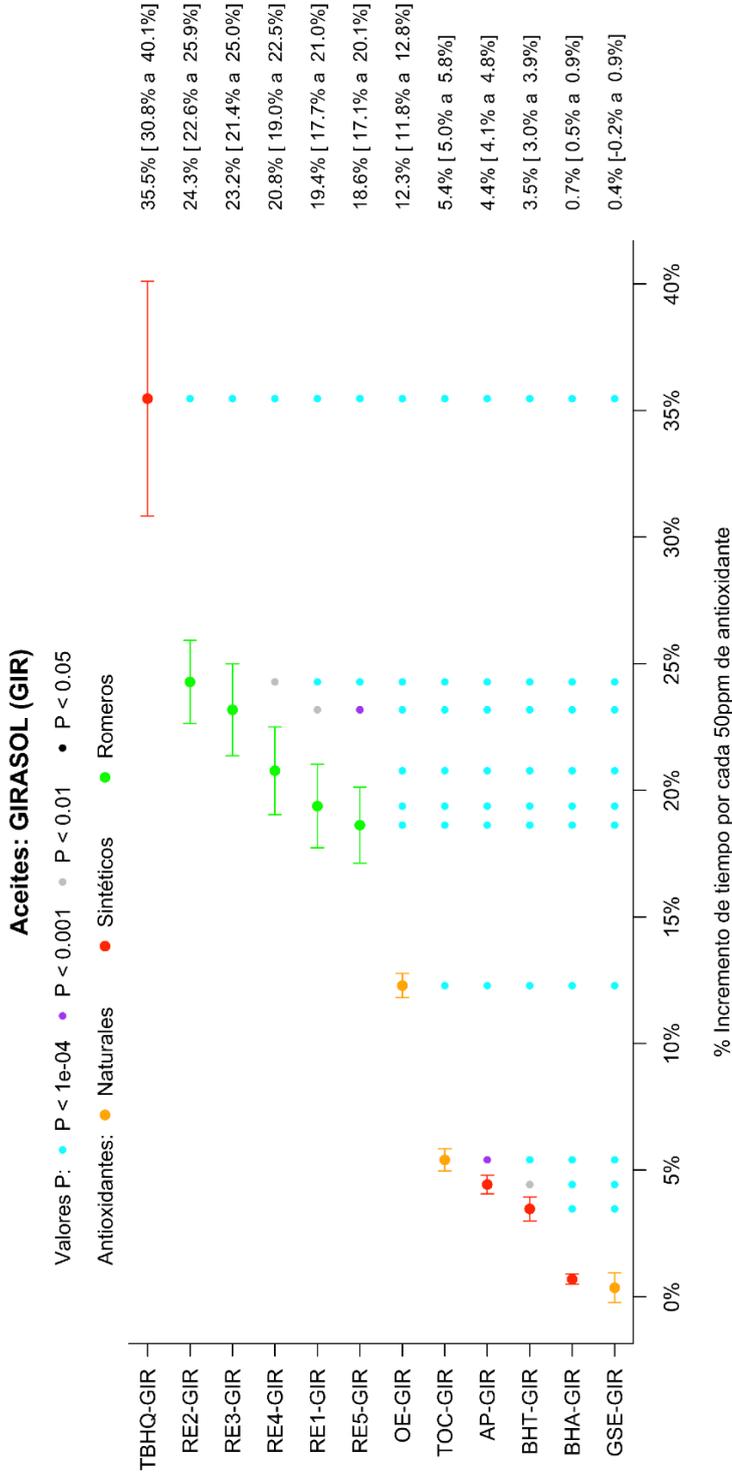
Antioxidante	Concentración de principio activo antioxidante							
	0 ppm		50 ppm		100 ppm		200 ppm	
	TI	±SD	TI	±SD	TI	±SD	TI	±SD
<b>BHA</b>	7,39	±0,18	7,68	±0,16	7,99	±0,17	8,37	±0,34
<b>BHT</b>	7,73	±0,06	7,74	±0,07	7,81	±0,04	7,97	±0,05
<b>TBHQ</b>	7,77	±0,16	11,98	±0,28	14,34	±0,49	17,89	±1,21
<b>AP</b>	7,63	±0,23	7,98	±0,21	8,37	±0,10	8,94	±0,13
<b>RE1</b>	7,58	±0,18	9,33	±0,21	11,04	±0,32	13,11	±0,40
<b>RE2</b>	7,80	±0,30	10,05	±0,39	12,03	±0,43	15,05	±0,67
<b>RE3</b>	7,45	±0,09	9,57	±0,22	11,37	±0,34	14,01	±0,51
<b>RE4</b>	7,66	±0,12	9,80	±0,32	11,27	±0,26	13,69	±0,45
<b>RE5</b>	7,70	±0,19	9,40	±0,19	11,00	±0,41	13,14	±0,59
<b>TOC</b>	7,71	±0,30	8,02	±0,14	8,42	±0,26	9,47	±0,37
<b>GSE</b>	7,44	±0,06	7,39	±0,05	7,46	±0,07	7,57	±0,40
<b>OE</b>	7,75	±0,20	8,78	±0,14	9,75	±0,56	11,49	±0,48

Resultados de TI (horas) obtenidos por el método Rancimat a 120°C, expresados en como media ±SD (n=2).

La Figura 5.6 muestra la representación gráfica del efecto de cada antioxidante sobre la estabilidad oxidativa de GIR en las condiciones estudiadas. Para cada concentración de antioxidante se expresa el FE como incremento porcentual del tiempo sobre el tiempo de referencia con concentración=0 (Blanco).



**Figura 5.6.** Gráfica descriptiva del efecto de cada antioxidante sobre la estabilidad oxidativa del aceite de girasol alto oleico en función de la concentración. En el eje de abscisas se describe la concentración (expresado en ppm de principio activo antioxidante); en el eje de ordenadas se refleja el factor de estabilidad (expresado como % de incremento de tiempo de inducción sobre el tiempo de referencia a concentración=0).



**Figura 5.7.** Gráfica comparativa del efecto de cada antioxidante sobre la estabilidad oxidativa del aceite de girasol alto oleico. En el eje de ordenadas se muestran los antioxidantes en orden ascendente en función de su efecto. En el eje de abscisas se representa el efecto de cada antioxidante (expresado como % de incremento de tiempo de inducción por cada 50ppm de principio activo antioxidante). A la derecha se describe el valor medio del efecto junto con su intervalo de confianza al 95% entre paréntesis.

La Figura 5.7 muestra el tamaño del efecto de cada antioxidante sobre la estabilidad oxidativa de GIR, así como el tamaño de las diferencias (p-valor) entre los efectos de los distintos antioxidantes. En ella, podemos observar que el orden de eficacia en matriz lipídica es el siguiente:

TBHQ> RE2> RE3> RE4> RE1> RE5> OE> TOC> AP> BHT> BHA> GSE

Una evaluación definida de los resultados mostrados en dicha figura sugiere la existencia de tres bloques de actividad bien definidos. En primer lugar, y de forma inequívoca, el TBHQ (35,5%), uno de los antioxidantes sintéticos, se constituye aisladamente como el antioxidante más efectivo para retardar la oxidación lipídica de GIR mostrando una diferencia de efecto estadísticamente significativa respecto al resto de las sustancias estudiadas, ( $p < 1e-04$  en todos los casos).

El segundo bloque, después del TBHQ, estaría formado por los cinco extractos de romero RE incluidos en este estudio (18,6-24,3%), cuyo rango de efectividad también es, claramente, superior al resto de antioxidante sintéticos y extractos vegetales estudiados ( $p < 1e-04$  en todos los casos).

Como un elemento aislado aparece después el OE (12,3%). Por un lado, muestra menor efecto que el grupo de los RE y el TBHQ ( $p < 1e-04$  en todos los casos) pero, por otro, su efecto es superior al resto de antioxidantes sintéticos y al otro extracto vegetal estudiados ( $p < 1e-04$  en todos los casos).

Finalmente, encontramos un tercer bloque, constituido por los tres compuestos sintéticos restantes, AP, BHT y BHA, además de dos productos de origen natural, TOC y GSE. Resulta significativo comprobar como los cuatro primeros compuestos mencionados (AP, BHT, BHA y TOC), que son probablemente los más utilizados como antioxidantes alimentarios, son los que muestran menores eficacias. El efecto de TOC (5,4%) en las condiciones descritas, es entre 3 y 5 veces inferior al efecto de los extractos de romero estudiados. AP (4,4%) y BHT (3,5%) manifiestan poca capacidad para estabilizar GIR en las condiciones estudiadas y el BHA (0,7%) no parece mostrar efecto alguno. El extracto GSE (0,4%) tampoco muestra capacidad alguna para estabilizar este aceite.

Resulta complejo establecer una relación directa entre estructura molecular y actividad en este ensayo en función de los resultados obtenidos, sobre todo porque en dicha relación intervienen otros parámetros como, por ejemplo, sus propiedades de solubilidad en medios lipídicos.

Si nos limitamos a considerar únicamente la presencia de ciertos aspectos simples y de grupos estructurales y funcionales en el esqueleto molecular del antioxidante, la conclusión sería casi inmediata:

- Presencia de un anillo fenólico (conjugación, capacidad de estabilización de radicales).
- Al menos dos grupos hidroxilo en el mismo anillo fenólico

El compuesto TBHQ cumple estas dos condiciones simultáneamente. Los extractos de romero igualmente, aunque con un peso molecular superior además de otras consideraciones por su esqueleto molecular más complejo (presencia de un grupo funcional ácido carboxílico). OE cumple también las tres condiciones, si bien la función alcohol primario supondría una cierta inestabilidad en la estabilización radical.

El resto de los compuestos, o bien carece de la presencia de un anillo fenólico, o bien dicho anillo solo incluye un grupo hidroxilo. En el caso de GSE, que cumple ambas condiciones, el hecho de tratarse de un extracto con una estructura muy polar, soluble en agua y con un peso molecular promedio de sus procianidinas elevado, impide una actividad antioxidante real en medio lipídico.

Todas estas consideraciones constituyen una primera aproximación al concepto estructura-actividad, una herramienta/premisa para poder realizar futuras investigaciones en el ámbito de la búsqueda y diseño de nuevos antioxidantes.

### 5.3.2.2. Aceite de Semilla de Uva

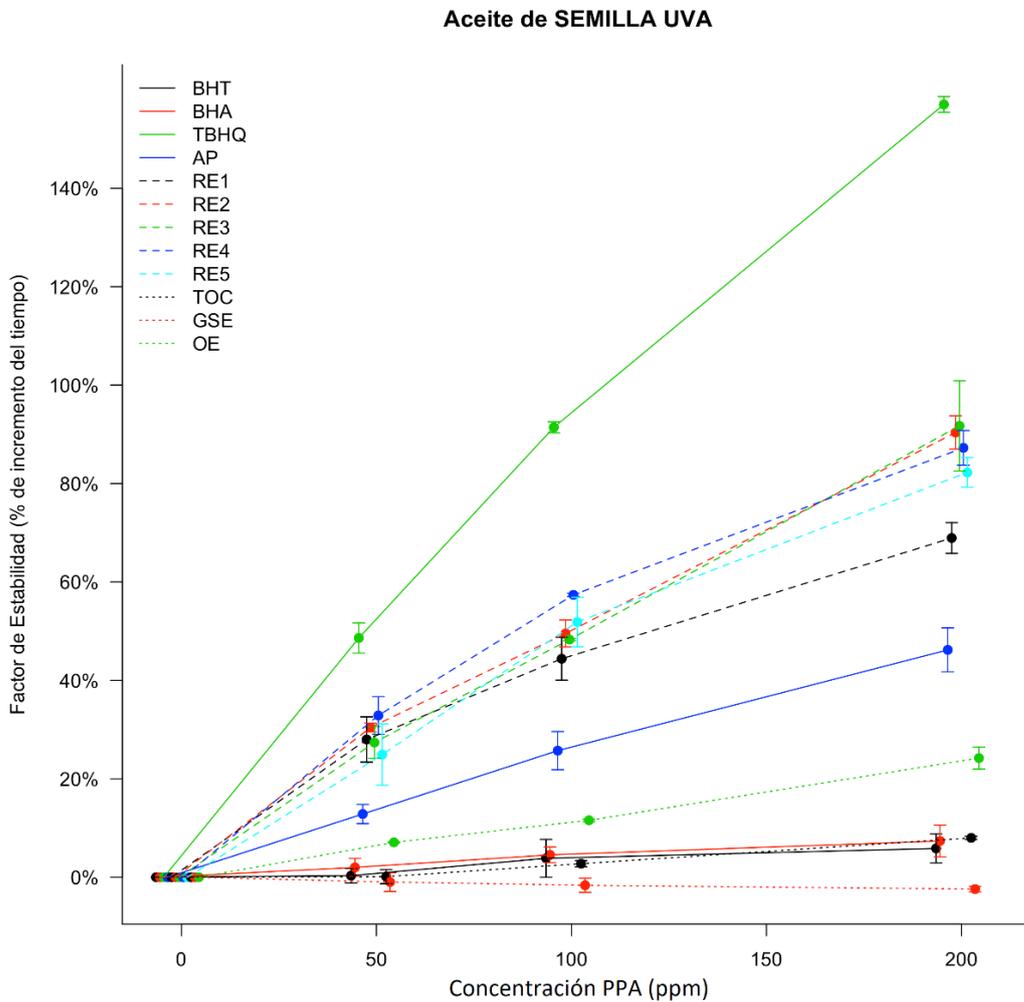
Los resultados de los TI de SEM a 110°C obtenidos tras la aplicación de cada uno de los antioxidantes estudiados a las distintas concentraciones seleccionadas (0, 50, 100 y 200 ppm PAA) se muestran en la Tabla 5.3.

**Tabla 5.3.** Efecto de los distintos antioxidantes sobre el tiempo de inducción del aceite de semilla de uva.

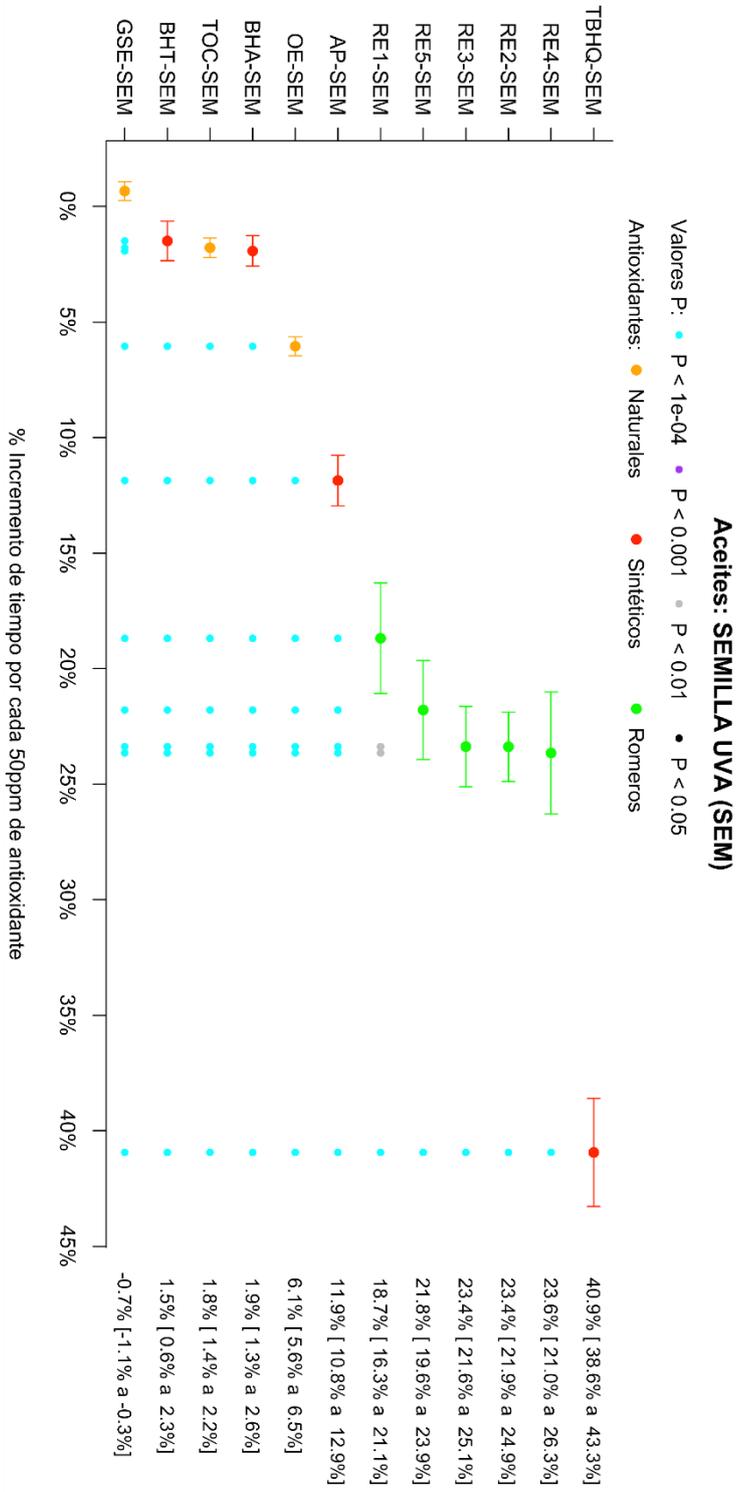
Antioxidante	Concentración principio activo antioxidante			
	0 ppm	50 ppm	100 ppm	200 ppm
	TI $\pm$ SD	TI $\pm$ SD	TI $\pm$ SD	TI $\pm$ SD
<b>BHA</b>	5,23 $\pm$ 0,39	5,24 $\pm$ 0,27	5,42 $\pm$ 0,20	5,53 $\pm$ 0,18
<b>BHT</b>	5,07 $\pm$ 0,43	5,17 $\pm$ 0,32	5,30 $\pm$ 0,38	5,44 $\pm$ 0,26
<b>TBHQ</b>	4,95 $\pm$ 0,10	7,36 $\pm$ 0,12	9,48 $\pm$ 0,12	12,72 $\pm$ 0,27
<b>AP</b>	4,99 $\pm$ 0,17	5,63 $\pm$ 0,35	6,26 $\pm$ 0,09	7,28 $\pm$ 0,17
<b>RE1</b>	5,22 $\pm$ 0,22	6,68 $\pm$ 0,60	7,54 $\pm$ 0,70	8,82 $\pm$ 0,60
<b>RE2</b>	5,21 $\pm$ 0,29	6,80 $\pm$ 0,46	7,79 $\pm$ 0,27	9,92 $\pm$ 0,37
<b>RE3</b>	5,12 $\pm$ 0,11	6,53 $\pm$ 0,34	7,59 $\pm$ 0,20	9,81 $\pm$ 0,43
<b>RE4</b>	4,99 $\pm$ 0,22	6,64 $\pm$ 0,52	7,86 $\pm$ 0,36	9,34 $\pm$ 0,28
<b>RE5</b>	4,99 $\pm$ 0,36	6,22 $\pm$ 0,27	7,56 $\pm$ 0,27	9,09 $\pm$ 0,47
<b>TOC</b>	5,07 $\pm$ 0,18	5,07 $\pm$ 0,23	5,21 $\pm$ 0,18	5,47 $\pm$ 0,17
<b>GSE</b>	5,12 $\pm$ 0,35	5,06 $\pm$ 0,23	5,03 $\pm$ 0,22	4,99 $\pm$ 0,26
<b>OE</b>	4,91 $\pm$ 0,04	5,26 $\pm$ 0,13	5,48 $\pm$ 0,07	6,10 $\pm$ 0,09

Resultados de TI (horas) obtenidos por el método Rancimat a 110°C, expresados en como media  $\pm$ SD (n=2).

La Figura 5.8. muestra la representación gráfica del efecto de cada antioxidante sobre la estabilidad oxidativa de SEM en las condiciones estudiadas. Para cada concentración de antioxidante se expresa el FE como incremento porcentual del tiempo sobre el tiempo de referencia con concentración=0 (Blanco).



**Figura 5.8.** Gráfica descriptiva del efecto de cada antioxidante sobre la estabilidad oxidativa del aceite de semilla de uva en función de la concentración. En el eje de abscisas se describe la concentración (expresado en ppm de principio activo antioxidante); en el eje de ordenadas se refleja el factor de estabilidad (expresado como % de incremento de tiempo de inducción sobre el tiempo de referencia a concentración=0).



**Figura 5.9.** Gráfica comparativa del efecto de cada antioxidante sobre la estabilidad oxidativa del aceite de semilla de uva. En el eje de ordenadas se muestran los antioxidantes en orden ascendente en función de su efecto. En el eje de abscisas se representa el efecto de cada antioxidante (expresado como % de incremento de tiempo de inducción por cada 50ppm de principio activo antioxidante). A la derecha se describe el valor medio del efecto junto con su intervalo de confianza al 95% entre paréntesis.

La Figura 5.9, muestra el tamaño del efecto de cada antioxidante sobre la estabilidad oxidativa de SEM, así como el tamaño de las diferencias (p-valor) entre los efectos de los distintos antioxidantes. En ella, podemos observar que el orden de eficacia en matriz lipídica es el siguiente:

TBHQ> RE4>RE2> RE3> RE5> RE1> AP> OE> BHA> TOC> BHT> GSE

Al igual que en GIR, una evaluación definida de los resultados mostrados en dicha figura sugiere la existencia de cuatro bloques de actividad muy similares a los tres del caso anterior. En primer lugar, y de forma aún más inequívoca, el TBHQ (40,9%), se constituye aisladamente como el antioxidante más efectivo para retardar la oxidación lipídica de GIR mostrando una diferencia de efecto estadísticamente significativa respecto al resto de las sustancias estudiadas, ( $p < 1e-04$  en todos los casos).

El segundo bloque, después del TBHQ, estaría formado por los cinco extractos de romero RE incluidos en este estudio (18,7-23,6%), cuyo rango de efectividad también es, claramente, superior al resto de antioxidante sintéticos y productos naturales estudiados ( $p < 1e-04$  en todos los casos).

Vamos a considerar como tercer bloque a dos compuestos, ambos un tanto aislados entre sí y respecto a los demás: AP (11,9%) y el extracto OE (6,1%). Ambos compuestos muestran un efecto es superior al resto de antioxidantes sintéticos y al otro extracto vegetal estudiados ( $p < 1e-04$  en todos los casos).

Finalmente, describimos un cuarto bloque, constituido por los dos compuestos sintéticos restantes, BHT y BHA, además de los otros dos productos de origen natural, TOC y GSE. Al igual que en GIR, comprobamos de nuevo como tres de los compuestos mencionados, que son probablemente los más utilizados como antioxidantes alimentarios, son los que muestran menores eficacias. El efecto de TOC (1,8%) en las condiciones descritas es, por ejemplo, entre 10 y 13 veces inferior al efecto de los extractos de romero estudiados. BHA (1,9%) y BHT (1,5%) muestran igualmente una actividad insignificante para estabilizar SEM en las condiciones estudiadas y el GSE (0,7%) no parece mostrar efecto alguno.

Del mismo modo que hicimos en el caso de GIR, y considerando que los resultados de eficacia son casi idénticos, nos limitamos a considerar únicamente la presencia de ciertos aspectos simples y de grupos estructurales y funcionales en el esqueleto molecular del antioxidante, la conclusión sería que la capacidad antilipoperoxidante se incrementa en las sustancias antioxidantes que muestran en su estructura química:

- La presencia de un anillo fenólico.
- La presencia de al menos 2 grupos hidroxilo en el mismo anillo fenólico.

Podemos considerar que en el caso de SEM la importancia relativa de cada elemento en la eficacia global sería algo diferente al caso de GIR. Para interpretar por qué AP presenta en este caso un resultado inferior a RE, pero superior a EO, el aspecto más diferenciador es el número de grupos hidroxilo libres en la molécula, 3 en el caso de AP. De ello, se podría deducir que el número de grupos hidroxilo es una variable más influyente en la capacidad antilipoperoxidante de los antioxidantes sobre el aceite de semilla de uva, respecto al aceite de girasol. Estas consideraciones solo constituyen una primera aproximación al concepto estructura-actividad, una herramienta/premisa para poder realizar futuras investigaciones en el ámbito de la búsqueda y diseño de nuevos antioxidantes.

### 5.3.2.3. Aceite de Pescado

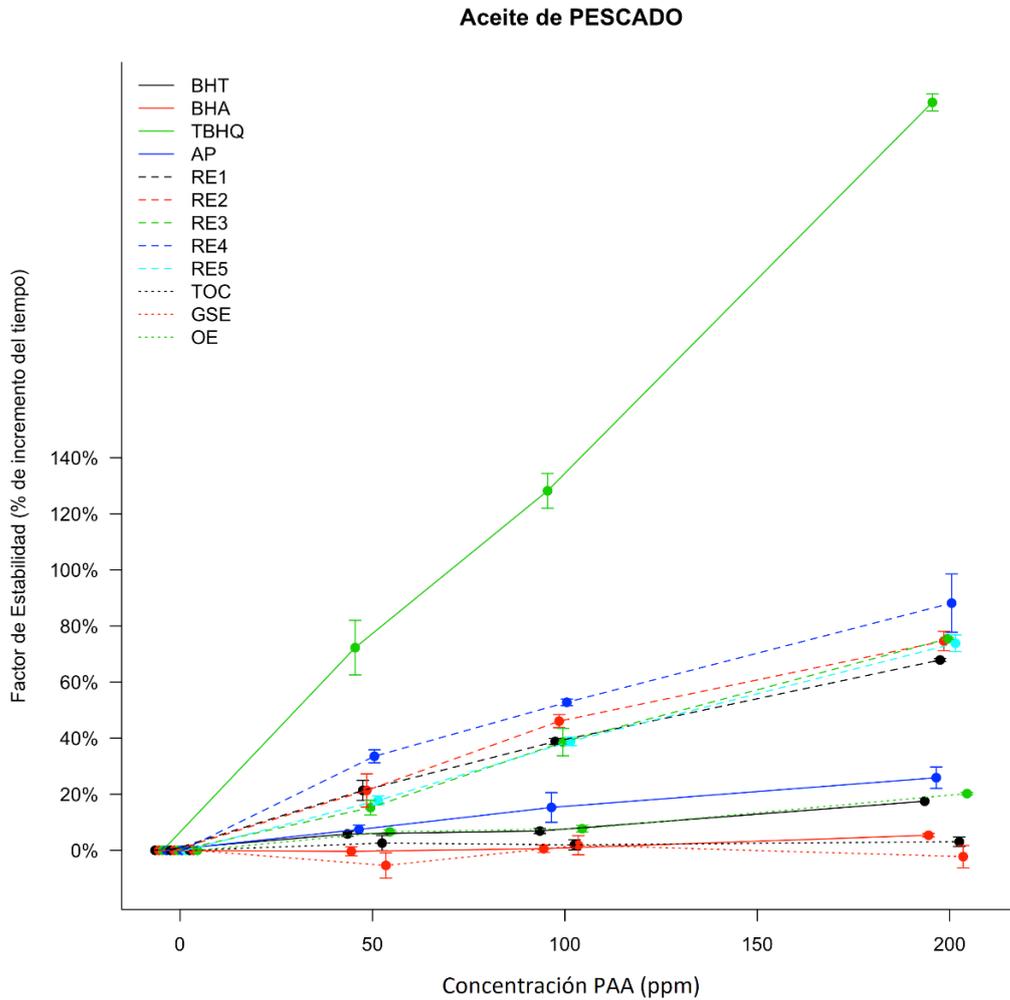
Los resultados de los TI de PES a 75°C obtenidos tras la aplicación de cada uno de los antioxidantes estudiados a las distintas concentraciones seleccionadas (0, 50, 100 y 200 ppm PAA) se muestran en la Tabla 5.4.

**Tabla 5.4.** Efecto de los distintos antioxidantes sobre el tiempo de inducción del aceite de pescado.

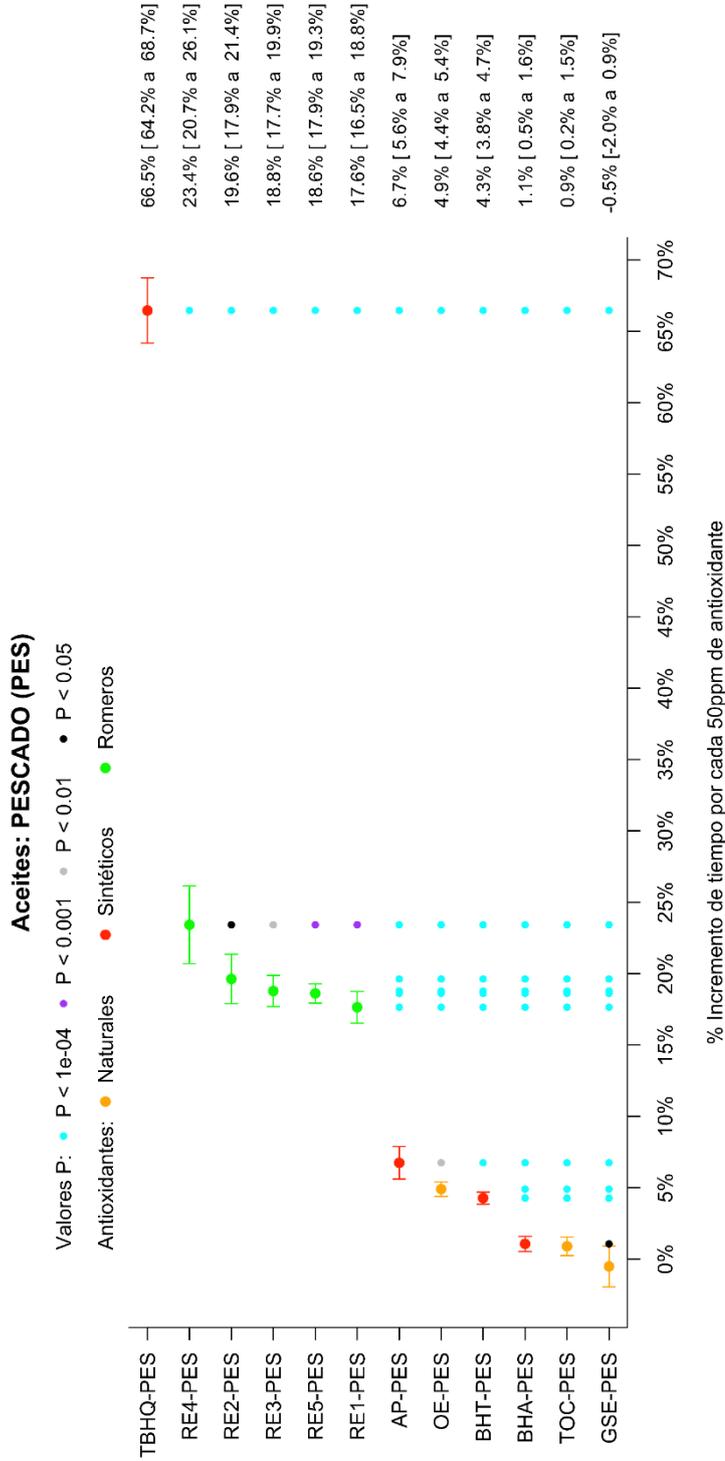
Antioxidante	Concentración Principio Activo Antioxidante			
	0 ppm	50 ppm	100 ppm	200 ppm
	<b>TI ±SD</b>	<b>TI ±SD</b>	<b>TI ±SD</b>	<b>TI ±SD</b>
<b>BHA</b>	3,77 ±0,13	3,99 ±0,11	4,03 ±0,15	4,43 ±0,05
<b>BHT</b>	3,51 ±0,22	3,50 ±0,26	3,53 ±0,26	3,69 ±0,19
<b>TBHQ</b>	3,56 ±0,04	6,14 ±0,40	8,13 ±0,34	13,07 ±0,14
<b>AP</b>	3,51 ±0,13	3,77 ±0,21	4,05 ±0,38	4,42 ±0,35
<b>RE1</b>	3,60 ±0,11	4,36 ±0,07	4,99 ±0,11	6,04 ±0,25
<b>RE2</b>	3,79 ±0,09	4,59 ±0,17	5,53 ±0,07	6,61 ±0,19
<b>RE3</b>	3,64 ±0,15	4,20 ±0,01	5,05 ±0,34	6,39 ±0,21
<b>RE4</b>	3,63 ±0,14	4,85 ±0,17	5,55 ±0,22	6,82 ±0,26
<b>RE5</b>	3,87 ±0,04	4,56 ±0,06	5,37 ±0,03	6,72 ±0,12
<b>TOC</b>	3,60 ±0,04	3,69 ±0,10	3,67 ±0,07	3,71 ±0,07
<b>GSE</b>	3,62 ±0,19	3,42 ±0,13	3,68 ±0,11	3,54 ±0,05
<b>OE</b>	3,60 ±0,18	3,84 ±0,11	3,88 ±0,15	4,33 ±0,10

Resultados de TI (horas) obtenidos por el método Rancimat a 75°C, expresados en como media ±SD (n=4).

La Figura 5.10. muestra la representación gráfica del efecto de cada antioxidante sobre la estabilidad oxidativa de PES en las condiciones estudiadas. Para cada concentración de antioxidante se expresa el FE como incremento porcentual del tiempo sobre el tiempo de referencia con concentración=0 (Blanco).



**Figura 5.10.** Gráfica descriptiva del efecto de cada antioxidante sobre la estabilidad oxidativa del aceite de pescado en función de la concentración. En el eje de abscisas se describe la concentración (expresado en ppm de principio activo antioxidante); en el eje de ordenadas se refleja el factor de estabilidad (expresado como % de incremento de tiempo de inducción sobre el tiempo de referencia a concentración=0).



**Figura 5.11.** Gráfica comparativa del efecto de cada antioxidante sobre la estabilidad oxidativa del aceite de pescado. En el eje de ordenadas se muestran los antioxidantes en orden ascendente en función de su efecto. En el eje de abscisas se representa el efecto de cada antioxidante (expresado como % de incremento de tiempo de inducción por cada 50ppm de principio activo antioxidante). A la derecha se describe el valor medio del efecto junto con su intervalo de confianza al 95% entre paréntesis.

La Figura 5.11, muestra el tamaño del efecto de cada antioxidante sobre la estabilidad oxidativa de PES, así como el tamaño de las diferencias (p-valor) entre los efectos de los distintos antioxidantes. En ella, podemos observar que el orden de eficacia en la matriz lipídica es el siguiente:

TBHQ> RE4>RE2> RE3> RE5> RE1> AP> OE> BHT> BHA> TOC> GSE

Este orden de relación es casi idéntico al obtenido en el caso de SEM, con mínimas diferencias de orden en los antioxidantes que muestran menos actividad. Una vez más, al igual que en el caso de GIR y SEM, una evaluación comparada de los resultados mostrados en dicha figura (Figura 5.11) sugiere la existencia de tres bloques de actividad fácilmente definibles: TBHQ, el grupo formado por los cinco extractos de romero y, en tercer lugar, el resto de sustancias estudiadas, si bien en éste último grupo podemos hacer una cierta subdivisión.

De forma aún más inequívoca que en los dos casos anteriores, el TBHQ se constituye aisladamente como el antioxidante más efectivo (66,5%), para retardar la oxidación lipídica de PES, mostrando, una diferencia de efecto estadísticamente significativa respecto al resto de las sustancias estudiadas, ( $p < 1e-04$  en todos los casos). El segundo bloque, después del TBHQ, estaría formado por los cinco RE incluidos en este estudio, cuyo rango de efectividad (17,6-23,4%) también es, claramente, superior al resto de antioxidante sintéticos y productos naturales estudiados ( $p < 1e-04$  en todos los casos). El tercer bloque de compuestos se caracteriza por un bajo efecto protector general, no obstante, podríamos considerar dos grupos de compuestos. En el primero incluiríamos a tres compuestos: AP (6,7%), OE (4,9%) y BHT (4.3%), entre OE y BHT no existe diferencia estadísticamente significativa, pero AP sí muestra diferencia estadísticamente significativa respecto a OE ( $p < 0,01$ ) y BHT ( $p < 1e-04$ ). Finalmente, el segundo grupo dentro del tercer bloque de compuestos lo constituirán: BHA (1.1%), TOC (0.9%) y GSE (-0.5%), todos ellos muestran una actividad insignificante o nula para estabilizar PES en las condiciones estudiadas ( $p < 1e-04$  en todos los casos).

Considerando que los resultados obtenidos en este estudio sobre PES resultan muy similares a los obtenidos para SEM en cuanto al orden de eficacia, eso sí, con diferencias cuantitativas, las hipótesis sobre el concepto estructura-actividad son igualmente aplicables a PES.

### 5.3.3. Efecto de la matriz alimentaria sobre la capacidad estabilizadora de los antioxidantes.

Uno de los objetivos del presente capítulo fue estudiar comparativamente los efectos protectores, frente a la oxidación acelerada, de cada uno de los antioxidantes en función de la naturaleza lipídica de la matriz alimentaria a la que se adicionasen, no olvidemos que los tres tipos de aceites empleados tienen una composición de ácidos grasos diferente, tal y como se ha descrito en capítulos anteriores: n-9 (mayoritario en GIR), n-6 (mayoritario en SEM) y n-3 (mayoritario en PES). No obstante, no olvidemos que, además del cambio de matriz alimentaria, las características de dicha matriz, su propia estabilidad a la oxidación en general, suponen diferentes temperaturas de trabajo en el modelo de oxidación acelerada: GIR (120°C), SEM (110°C) y PES (75°C).

Estas diferentes temperaturas, necesarias para poder observar y evaluar correctamente el proceso de oxidación pueden afectar también a la estabilidad molecular del propio antioxidante, con lo cual, los efectos observados podrían ser el resultado conjunto tanto de una mayor afinidad/especificidad en la protección de cada tipo de ácido graso, como de la estabilidad del compuesto antioxidante en las condiciones del ensayo. Establecer la contribución de cada uno de estos elementos resultaría sumamente complejo y debería ser objeto de posteriores trabajos de investigación más específicos.

De cualquier manera, no olvidemos tampoco, que este estudio pretende evaluar de forma comparada, global y aplicada la capacidad protectora de todos estos compuestos a través de diferentes ensayos y diferentes temperaturas (T<sup>a</sup>, 40°C, 60°C, 75°C, 110°C y 120°C), en consecuencia, las condiciones necesarias de estudio en cada tipo de ensayo forman parte obvia de las condiciones aplicadas de comparación, permitiendo así que dicha comparación aplicada sea en todo momento realista en el uso de los mismos.

Los datos de estabilidad “per se” de los compuestos sintéticos empleados en el estudio muestran algunos datos controvertidos; en algunos trabajos se habla de su resistencia a altas temperaturas, sobre todo en el caso más evidente del TBHQ (no olvidemos que se trata del antioxidante más empleado en aceites de fritura), del que se indican deterioros del 10% a temperaturas cercanas a 180°C (Reda, 2011).

En el caso de BHT y BHA, hay más controversia, si bien no se recomienda su uso a temperaturas superiores a 110°C. La estructura molecular del AP parece comenzar a mostrar cierta inestabilidad a temperaturas superiores a los 110°C (Reda, 2011; Santos *et al.*, 2012).

En cuanto a los productos naturales, trabajar a temperaturas en el entorno de 110-120°C no supone problema en cuanto a su estabilidad estructural, tal es así en el caso de las procianidinas de GSE, como, sobre todo en OE (hidroxitirosol) (Khanal, Howard, & Prior, 2010; Tu & Yuan, 2018) y tocoferoles (Santos *et al.*, 2012). En cuanto a los extractos de romero (ácido carnósico y carnosol), serían, precisamente, los extractos más sensibles a la temperatura ya que, por ejemplo, a 120°C al cabo de varias horas se produce una reducción de la concentración de diterpenos situada en el entorno del 10-15% (datos propios de Nutrafur, no publicados).

En definitiva, no vamos a poder concluir siempre y con precisión en cada análisis comparativo: “este compuesto presenta una mayor capacidad protectora de tal o cual aceite, de tal o cual tipo de ácido graso” por criterios exclusivamente de afinidad molecular, pero si a construir una hipótesis razonable, resultado de la combinación capacidad-estabilidad.

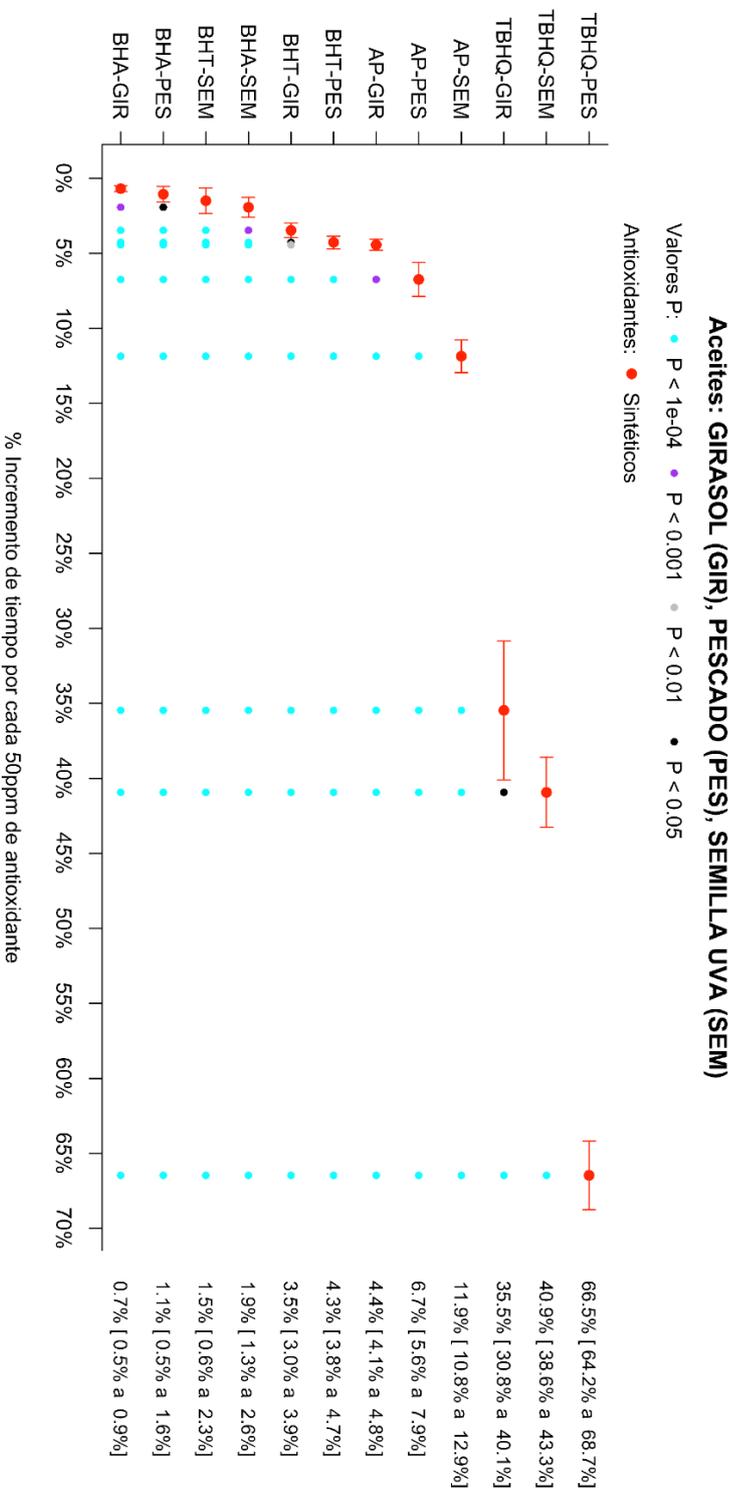
Mediante el análisis comparativo de las pendientes de las rectas previamente calculadas (obtenidas por regresión lineal del incremento porcentual del tiempo en función de la concentración de antioxidante), pudimos determinar si la diferencia del efecto estabilizador de un antioxidante concreto en función de la matriz lipídica sobre la que se aplica presenta o no un tamaño estadísticamente significativo. Reflejamos las diferencias de estos efectos en gráficas similares a las ya descritas para describir la eficacia comparativa de los efectos de cada antioxidante dentro de un mismo aceite (ver apartado 5.3.1: pag.295) para explicación de la lectura de las gráficas). En esta ocasión, en vez de agrupar los resultados en función de cada tipo de aceite, lo hicimos en función de cada grupo de antioxidantes descrito en esta memoria: sintéticos, extractos de romero y otros antioxidantes de origen natural.

### 5.3.3.1. Antioxidantes Sintéticos

Tal y como se ha descrito anteriormente, el antioxidante TBHQ es el que mostró una mayor capacidad para retardar la oxidación lipídica en los tres aceites estudiados (35,5-66,5%). La diferencia de efecto de este antioxidante sobre SEM (40,9%) y GIR (35,5%) no se mostró estadísticamente muy significativa ( $p < 0,05$ ). Sin embargo, el valor de gran capacidad de TBHQ de estabilizar PES (66,5%), muy por encima de SEM (40,9%) y GIR (35,5%), si mostró dicha significancia ( $p < 1e-04$  para ambos casos) (Figura 5.12). No podemos asegurar, en función de los datos de estabilidad antes mencionados, que la mayor eficacia de TBHQ en PES sea debida a la menor temperatura del ensayo, a pesar de que exista una proporcionalidad casi lineal entre ambos parámetros. Es un hecho que solo se produce en el caso de este compuesto que, por otro lado, tal y como ya se ha mencionado, es el compuesto más utilizado en la industria alimentaria en los aceites de fritura, por su mayor estabilidad a altas temperaturas; no parece lógico pues que este parámetro sea el principal responsable de estos resultados.

El antioxidante AP (capacidad para retardar la oxidación lipídica en los tres aceites estudiados: 4,4-11,9%) se muestra más efectivo en SEM (11,9%) que en PES (6,7%) y GIR (4,4%) con una diferencia de efecto de  $p < 1e-04$  para ambos casos. La diferencia de efecto de AP entre PES (6,7%) y GIR (4,4%) es menor ( $p < 0,001$ ) (Figura 5.12). Dada la razonable estabilidad de este compuesto a altas temperaturas, podría sugerirse que AP muestra una cierta mayor afinidad "protectora" por SEM (n-6).

El antioxidante BHT (capacidad para retardar la oxidación lipídica en los tres aceites estudiados: 1,5-4,3%) presenta su mayor efecto sobre PES (4,3%) y GIR (3,5%), la diferencia de ambos efectos no es muy significativa ( $P < 0,05$ ). Sí que lo es con respecto a SEM (1,5%), con valor de  $p < 1e-04$  para ambos casos. El efecto de BHA (0,7%-1,9%) es superior para SEM (1,9%) en relación con PES (1,1%) y GIR (0,7%), con una diferencia de efecto significativa con valores de  $p < 0,05$  y  $p < 0,001$ , respectivamente (Figura 5.12). La muy reducida capacidad comparada de protección de estos compuestos impide establecer hipótesis acerca de la existencia de una mayor o menor afinidad de protección por algún tipo concreto de aceite.



**Figura 5.12.** Gráfica comparativa del efecto del grupo de los antioxidantes sintéticos sobre el aceite de girasol alto oleico (GIR), el aceite de semilla de uva (SEM) y el aceite de pescado (PES). En el eje de ordenadas se muestran los antioxidantes en orden ascendente en función de su efecto junto al aceite sobre el que ejercen dicho efecto. En el eje de abscisas se representa el efecto de cada antioxidante (expresado como % de incremento de tiempo de inducción por cada 50ppm de principio activo antioxidante). A la derecha se describe el valor medio del efecto junto con su intervalo de confianza al 95% entre paréntesis.

### 5.3.3.2. Extractos de Romero

El efecto de RE1 (capacidad para retardar la oxidación lipídica en los tres aceites estudiados: 17,6-19,4%) no muestra diferencias significativas en su capacidad para proteger a los distintos aceites GIR (19,4%)> SEM (18,7%)> PES (17,6%) (Figura. 5.13).

El efecto de RE2 (capacidad para retardar la oxidación lipídica en los tres aceites estudiados: 19,6-24,3%) no muestra diferencias significativas en su capacidad para proteger GIR (24,3%) y SEM (23,4%), sin embargo, su efecto sobre PES (19,6%) si muestra diferencias estadísticamente significativas respecto a GIR (24,3%) y SEM (23,4%), con valor  $p < 0,001$  y  $p < 0,01$  para ambas diferencias respectivamente (Figura. 5.13).

El efecto de RE3 (capacidad para retardar la oxidación lipídica en los tres aceites estudiados: 18,8-23,4%) no muestra diferencias significativas en su capacidad para proteger SEM (23,4%) y GIR (23,2%), sin embargo, su efecto sobre PES (18,8%) si muestra diferencias estadísticamente significativas respecto a SEM (23,4%) y GIR (23,2%), con valor  $p < 0,01$  y  $p < 1e-04$  para ambas diferencias respectivamente. Un comportamiento similar al que muestra RE2 (Figura. 5.13).

El efecto de RE4 (capacidad para retardar la oxidación lipídica en los tres aceites estudiados: 20,8-23,6%) sobre SEM (23,6%), PES (23,4%) y GIR (20,8%) no muestra diferencias estadísticamente significativas (Figura. 5.13).

El efecto de RE5 (capacidad para retardar la oxidación lipídica en los tres aceites estudiados: 19,6-21,8%) sobre SEM (21,8%) es estadísticamente superior a los efectos sobre GIR (18,6%) y PES (18,6%), con un valor de  $p < 0,05$  y  $p < 0,01$ , respectivamente (Figura. 5.13).

Todos estos resultados muestran un comportamiento de los RE muy homogéneo, incluso consistente, en cuanto a su capacidad protectora frente a la oxidación acelerada de los tres tipos de aceites estudiados. Únicamente, podría sugerirse que, en general, presentan menos capacidad para proteger PES (17,6-23,4%) que para proteger GIR (18,6-24,3%) y SEM (18,7-23,6%), si bien, estas diferencias son solo significativas para los extractos RE2, RE3 y RE5. En un apartado posterior completaremos esta comparativa incluyendo ya el concepto

molecular, es decir, la relación entre las proporciones relativas de los dos diterpenos activos en el extracto, la ratio CA/COL.

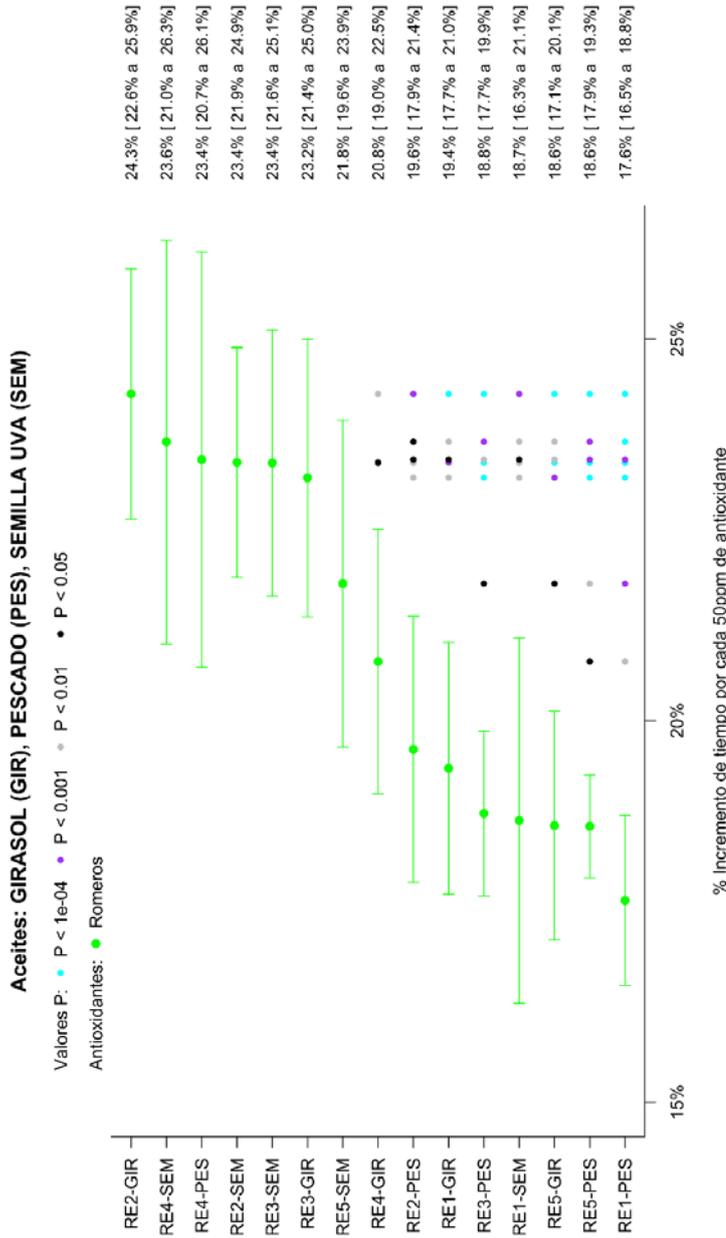
Parece evidente que en el caso de los extractos de romero la posible influencia de la temperatura en la estabilidad de los diterpenos no parece ser significativa.

### *5.3.3.3. Otros antioxidantes naturales*

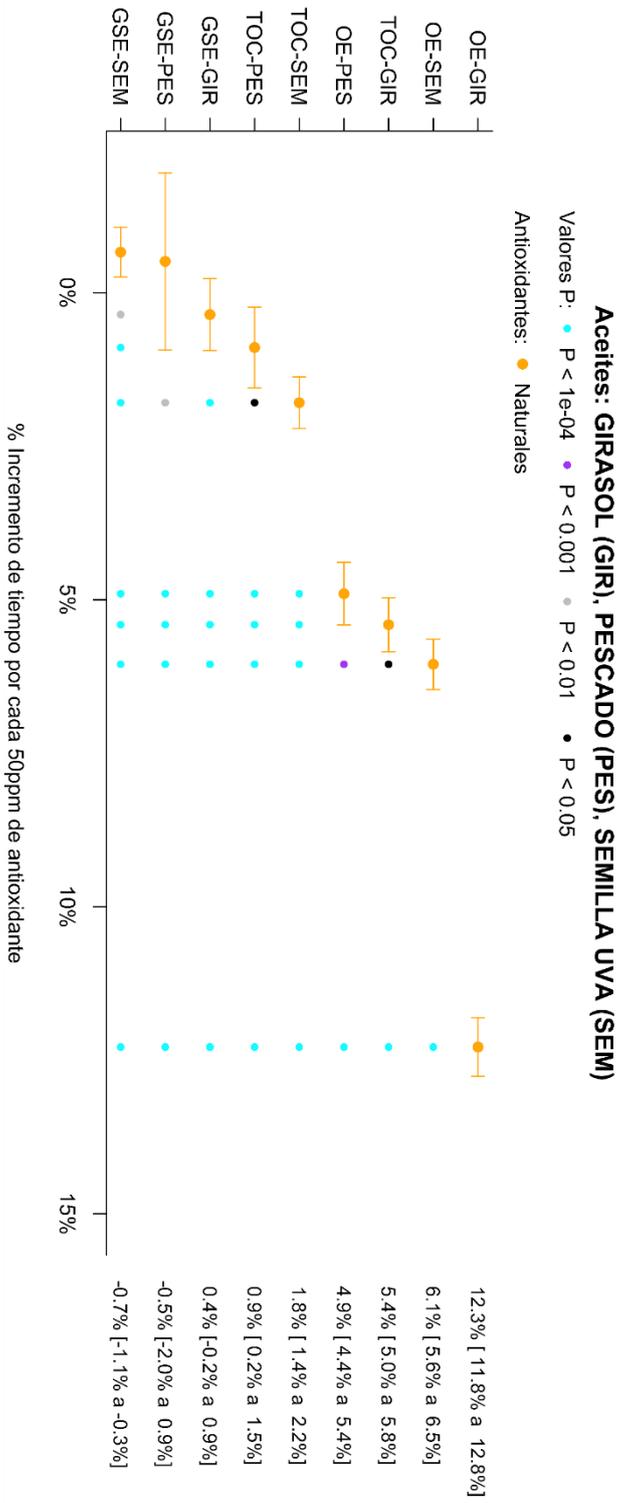
A través de todos los datos hasta ahora descritos en esta memoria, es evidente que se trata de tres compuestos cuya capacidad de protección en condiciones de oxidación acelerada de medios lipídicos es bastante reducida. No obstante, lo que sí resulta interesante es que el OE presenta, globalmente, una mayor eficacia que TOC, uno de los productos más empleados como antioxidante de origen natural en la industria alimentaria.

La diferencia entre los efectos de OE (capacidad para retardar la oxidación lipídica en los tres aceites estudiados: 4,9-12,3%) sobre SEM (6,1%) y PES (4,9%) es estadísticamente significativa, con un valor  $p < 0,001$ . Sin embargo, llama la atención la gran capacidad de OE para estabilizar GIR (12,3%), muy superior proporcionalmente a SEM (6,1%) y PES (4,9%), con un valor de  $p < 1e-04$  para ambos casos (Figura 5.14). La diferencia entre los efectos de TOC (capacidad para retardar la oxidación lipídica en los tres aceites estudiados: 0,9-5,4%) sobre SEM (1,8%) y PES (0,9%) no es estadísticamente muy significativa, con un valor  $p < 0,05$ . Sin embargo, el efecto de TOC sobre GIR (5,4%) sí muestra una diferencia estadísticamente muy significativa respecto a SEM (1,8%) y PES (0,9%), con un valor de  $p < 1e-04$  para ambos casos (Figura 5.14). El GSE (capacidad para retardar la oxidación lipídica en los tres aceites estudiados: -0,7-0,4%) no presenta efecto protector alguno sobre ninguno de los tres aceites estudiados (Figura 5.14).

Tal y como se ha mencionado anteriormente, estos tres compuestos son térmicamente muy estables en el rango de temperaturas de trabajo de estos ensayos.



**Figura 5.13.** Gráfica comparativa del efecto del grupo de los extractos de romero sobre el aceite de girasol alto oleico (GIR), el aceite de semilla de uva (SEM) y el aceite de pescado (PES). En el eje de ordenadas se muestran los antioxidantes en orden ascendente en función de su efecto-junto al aceite sobre el que ejercen dicho efecto. En el eje de abscisas se representa el efecto de cada antioxidante (expresado como % de incremento de tiempo de inducción por cada 50ppm de principio activo antioxidante). A la derecha se describe el valor medio del efecto junto con su intervalo de confianza al 95% entre paréntesis.



**Figura 5.14.** Gráfica comparativa del efecto del grupo de otros extractos naturales sobre el aceite de girasol alto oleico (GIR), el aceite de semilla de uva (SEM) y el aceite de pescado (PES). En el eje de ordenadas se muestran los antioxidantes en orden ascendente en función de su efecto-junto al aceite sobre el que ejercen dicho efecto. En el eje de abscisas se representa el efecto de cada antioxidante (expresado como % de incremento de tiempo de inducción por cada 50ppm de principio activo antioxidante). A la derecha se describe el valor medio del efecto junto con su intervalo de confianza al 95% entre paréntesis.

### 5.3.4. Efecto de la relación ácido carnósico/carnosol del extracto de romero sobre su capacidad de estabilización lipídica.

El último objetivo de este capítulo fue el de comparar la capacidad estabilizadora entre los distintos RE sobre cada una de las tres matrices alimentarias estudiadas, con el fin de evaluar la posible influencia sobre dicha capacidad de la relación entre las concentraciones de CA y COL, los dos diterpenos responsables de esa capacidad, tal y como ya se ha descrito. Además, el análisis del efecto de la ratio CA/COL sobre la estabilidad oxidativa de las distintas matrices alimentarias, nos permitió establecer posibles relaciones entre la composición de los RE y la distribución lipídica de cada una de dichas matrices: GIR, mayoritaria en ácidos grasos n-9, SEM, mayoritaria en ácidos grasos n-6 y PES, mayoritaria en ácidos grasos n-3.

En la Tabla 5.5 se muestra el % de incremento de tiempo de estabilidad por cada 50 ppm de PAA para cada uno de los cinco RE estudiados en las tres matrices alimentarias. Para facilitar la interpretación de la relación entre la capacidad antilipoperoxidante y la distribución CA/COL, se incluyen de nuevo en esta tabla tanto las concentraciones absolutas de diterpenos como su ratio.

**Tabla 5.5.** Efecto de la ratio ácido carnósico/carnosol sobre la estabilidad oxidativa de los aceites de girasol, semilla de uva y pescado determinada por Rancimat.

RE	CA <sup>a</sup>	COL <sup>a</sup>	CA/COL <sup>b</sup>	GIR <sup>c</sup>	SEM <sup>c</sup>	PES <sup>c</sup>
RE1	5,76	15,55	0,37	19,4	18,7	17,6
RE2	15,35	5,40	2,84	24,3	23,4	19,6
RE3	34,34	5,41	5,60	23,2	23,4	18,8
RE4	3,82	0,72	5,34	20,8	23,6	23,4
RE5	75,65	5,16	14,66	18,6	21,8	18,6

<sup>a</sup> Concentración de CA y COL expresada en términos de % de contenido absoluto. <sup>b</sup> Ratio CA/COL es un coeficiente, no tienen unidades. <sup>c</sup> Efecto sobre la estabilidad oxidativa del aceite, expresado como % de incremento de tiempo por cada 50ppm de PAA.

*5.3.4.1. Efecto de la relación ácido carnósico/carnosol del extracto de romero sobre su capacidad para estabilizar el aceite de girasol alto oleico.*

El incremento en el tiempo de estabilidad por cada 50 ppm de PAA añadidas a GIR oscila en el rango de 18,6 a 24,3% (Tabla 5.5), siendo el orden de actividad el siguiente: RE2 (2,84) > RE3 (5,60) > RE4 (5,34) > RE1 (0,37) > RE5 (14,66) (Tabla 5.5).

Desde el punto de vista de la estadística: la diferencia de efectos entre los extractos RE2 (24,3%) y RE3 (23,2%) no es estadísticamente significativa. Sin embargo, el efecto de RE2 (24,3%) sí muestra diferencias estadísticamente significativas respecto a RE4 (20,8%), RE1 (19,4%) y RE5 (18,6%); con un valor de  $p < 0,01$ ;  $p < 1e-04$  y  $p < 1e-04$  para los tres RE, respectivamente (Figura 5.7; pag. 289). La diferencia de efecto de RE3 (23,2%) respecto a RE4 (20,8%) no es estadísticamente significativa. Sin embargo, sí lo es respecto a RE1 (19,4%) y RE5 (18,6%), con un valor de  $p < 0,01$  y  $p < 0,001$  para los dos RE respectivamente. Las diferencias entre sí de los efectos de RE4, RE1 y RE5 no muestran un tamaño estadísticamente significativo. (Figura 5.7).

En relación con este concepto, ya se ha mencionado anteriormente que existe una muy escasa investigación sobre la posible influencia de la relación CA/COL en la actividad antioxidante del RE, y es importante que recordemos ahora dos ideas básicas que ya se mencionaron en el capítulo del ensayo con DPPH acerca de este tema.

En primer lugar, que autores muy significados en este tema (Aruoma, Halliwell, Aeschbach, & Löliger, 1992) establecieron que más del 90% de la actividad antioxidante del romero se debía a la presencia de dos compuestos diterpénicos: CA y COL. Desde entonces, ha habido controversia sobre cuál de ellos posee la mayor actividad antioxidante.

Y en segundo lugar, y no menos importante, el hecho de que en el metabolismo oxidativo del CA (ver Figura 2.16; pag. 160), varios estudios sugieren que aunque el ácido 6,7-dehidrocarnósico es el primer paso en la vía de oxidación de CA (Del Baño, Benavente-García, Marín, Marín, & Castillo, 2006; Munne-Bosch, Schwarz, & Alegre, 1999), este compuesto se transforma casi inmediatamente en otros dos: ácido 7-ceto-carnosico y, principalmente, COL, es decir, el propio COL es el principal metabolito del CA.

Los resultados relativos al incremento en el tiempo de estabilidad por cada 50 ppm de PAA (CA+COL) añadidos a GIR (Tabla 5.5), sugieren una tendencia de comportamiento con una especie de máximo en el entorno de una ratio 2,5-3,0, la correspondiente al extracto RE2, un perfil muy similar al obtenido en el ensayo DPPH para este mismo concepto. No podemos justificar molecularmente la diferencia de capacidad entre RE3 y RE4, ambos con la misma ratio, es posible que dichas diferencias puedan deberse al hecho de que uno de los extractos es sólido y el otro es una disolución de ambos diterpenos en aceite de girasol, similar al de la matriz estudiada, algo que está ya siendo objeto de nuevos estudios. RE1 y RE5 presentan menores capacidades de protección de forma estadísticamente significativas, parece por tanto sugerirse que la combinación de ambos diterpenos en determinadas proporciones resulta clave para incrementar la eficacia de los extractos, y que extractos que contienen mayoritariamente uno cualquiera de los dos diterpenos, reducen su eficacia relativa. Además, dicha disminución de capacidad protectora resulta muy similar, con lo cual no es posible a través de los resultados de este ensayo evaluar si CA es más activo que COL, o viceversa en el aceite de girasol alto oleico.

*5.3.4.2. Efecto de la relación ácido carnósico/carnosol del extracto de romero sobre su capacidad para estabilizar el aceite de semilla de uva.*

El incremento en el tiempo de estabilidad por cada 50 ppm de PAA añadidas a SEM oscila en el rango de 18,7 a 23,6%, siendo el orden de actividad el siguiente: RE4 (5,34) = RE2 (2,84) = RE3 (5,60) > RE5 (14,66) > RE1 (0,37) (Tabla 5.5).

Desde el punto de vista de la estadística, las diferencias de efecto entre RE4 (23,6%), RE2 (23,4%), RE3 (23,4%) y RE5 (21,8%) no son estadísticamente significativas. Solo el efecto de RE4 (23,6%), RE2 (23,4%) y RE3 (23,4%) muestran diferencias estadísticamente significativas respecto a RE1 (18,7%), con un valor de  $p < 0,01$  para los tres extractos (Figura 5.9; pag. 304).

En este caso, hablaríamos de un comportamiento casi asintótico a partir de una ratio, probablemente, en el entorno de 2,5-3,0; aunque parezca existir una cierta disminución de eficacia con ratios muy elevadas, como es el caso de RE5. Lo que sí parecen mostrar los resultados obtenidos en SEM, es que, individualmente

considerados el CA (mayoritario en RE5) tendría una mayor capacidad protectora que el COL (mayoritario en RE1).

¿Podría pues decirse que CA tiene una mayor afinidad protectora relativa que COL por ácidos grasos n-6 (SEM), mientras que tendrían una afinidad relativa similar por ácidos grasos n-9 (GIR)? A nuestro juicio, estas potenciales afirmaciones requieren de futuros estudios, molecularmente más profundos y específicos, que demuestren esta tendencia observada.

#### *5.3.4.3. Efecto de la ratio ácido carnósico/carnosol sobre la estabilidad oxidativa de PES*

El incremento en el tiempo de estabilidad por cada 50 ppm de PAA añadidas al PES oscila en el rango de 17,6 a 23,4% siendo el orden de actividad el siguiente: RE4 (5,34) > RE2 (2,84) > RE3 (5,60) > RE5 (14,66) > RE1 (0,37) (Tabla 5.5).

Desde el punto de vista de la estadística, el efecto de RE4 (23,4%) muestra diferencias estadísticamente significativas frente a los efectos de los otros cuatro RE, con un valor de  $p < 0,05$  respecto a RE2 (19,6%);  $p < 0,01$  respecto a RE3 (18,8%) y  $p < 0,001$  respecto a RE5 (18,6%) y RE1 (17,6%). Sin embargo, las diferencias de efectos entre RE2 (19,6%), RE3 (18,8%), RE5 (18,6%) y RE1 (17,6%) no son estadísticamente significativas (Figura 5.11; pag. 309).

En este aceite PES, rico en n-3, es de nuevo el extracto RE4 el que muestra una mayor actividad protectora, con una ratio de 5,34, sugiriendo también una especie de curva con un máximo en dicho valor, de tal forma que el resto de valores quedan en un mismo plano, es decir, sin diferencias reales entre sí.

En general, tras evaluar toda esta serie de datos, no resulta fácil extraer conclusiones bien definidas a partir de este estudio acerca de la mayor o menor selectividad/afinidad molecular de los extractos de romero por un aceite determinado, por unos ácidos grasos determinados, en función de las relación entre las concentraciones de CA y COL, aunque sí podemos establecer una serie de tendencias de comportamiento que ya están siendo objeto de nuevos estudios y de su potencial aplicabilidad industrial.

Ya se han descrito y comentado ampliamente en el capítulo del DPPH, diversas consideraciones recogidas por estudios precedentes sobre los diterpenos

del romero, su actividad relativa, sus capacidades, su metabolismo oxidativo, su interrelación molecular, etc., y que, en general, el diterpeno mayoritario en RE, CA, es el compuesto con mayor actividad antioxidante/protectora.

Nuestros resultados parecen confirmar que el CA tiene una mayor actividad antioxidante que el COL y sugieren que la presencia de una cierta proporción de COL, en un cierto rango de valores CA/COL (en el entorno de 2,0 y 6,0), genera un efecto antioxidante sinérgico, probablemente porque es el principal metabolito estable de la cadena oxidativa del CA, y su presencia mejora la estabilidad oxidativa del mismo. La presencia inicial de cierta proporción del metabolito COL en el extracto, permitiría una mayor estabilidad del CA presente, reduciendo el valor de K en la cinética de degradación de CA, cuando el extracto actúa como antioxidante protegiendo la oxidación lipídica.

Desde otro punto de vista, ¿podríamos decir que CA y COL, individualmente considerados, protegen mejor un aceite que otro? Para ello, la mejor aproximación es evaluar los extractos RE1, mayoritario en COL, y el extracto RE5, que podríamos considerar prácticamente como CA. El efecto de RE1 (17,6-19,4%) no muestra diferencias significativas en su capacidad para proteger a los distintos aceites GIR (19,4%) > SEM (18,7%) > PES (17,6%) (Figura 5.13; pag. 317)). Es decir, un extracto mayoritario en COL (ratio COL/CA inversa a la estudiada: 2,70), no “protege” mejor unos aceites que otros. En cambio, el efecto de RE5 (19,6-21,8%) sobre SEM (21,8%) es estadísticamente superior a los efectos sobre GIR (18,6%) y PES (18,6%), con un valor de  $p < 0,05$  y  $p < 0,01$ , respectivamente (Figura 5.13); podríamos pues decir que CA parece “proteger” mejor ácidos grasos n-6, que n-9 y n-3.

Es evidente, tras realizar estos estudios que, aún no disponemos de datos concretos sobre la posible existencia o no de sinergia en combinaciones inversas de CA y COL, es decir, mayoritarias en COL. Si hablamos de la ratio COL/CA, hemos trabajado con los siguientes valores: 2,70, 0,35, 0,19, 0,18 y 0,07. ¿Qué podría ocurrir con ratios superiores a 2,70?, esto será objeto de próximos estudios.

Si bien desde el punto de vista científico y molecular no pueden extraerse conclusiones muy profundas, las valoraciones estadísticamente significativas, e incluso las tendencias observadas, representan una información de gran valor desde el punto de vista industrial aplicado. Inicialmente, la distribución de

diterpenos de un extracto es el resultado de un extracto nativo obtenido, con un determinado procedimiento, a partir de una hoja de romero con unas características concretas. En consecuencia, estas informaciones nos permitirán, por un lado, elegir materiales vegetales más idóneos para cada objetivo de aplicación y, por otro, rediseñar condiciones de extracción igualmente más idóneas. Dado que las características de un extracto de romero también pueden modificarse mediante procesos selectivos de separación de compuestos y purificación, posteriores a la extracción, estas informaciones también constituyen una herramienta clave en el diseño de dichos procesos.

En una aplicación industrial es importante tener en cuenta también el criterio de rentabilidad económica. En un caso concreto de aplicación de extractos de romero en la protección de aceite de girasol alto oleico, el uso de un extracto con una ratio CA/COL de 2,84, supondría, para conseguir el mismo efecto protector que otros extractos de ratios superiores (mayor contenido de CA), una reducción de costes de aplicación en el rango [-5 a - 23%]. Estos son datos muy significativos para la industria alimentaria.

En definitiva, a nivel industrial, esta información pretende facilitar el desarrollo de nuevos y más eficaces extractos destinados a ser empleados como aditivos alimentarios, adaptados al alimento que se pretenda proteger contra la oxidación, en función de su naturaleza lipídica.

#### 5.4. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este capítulo concluyen que:

1. El antioxidante sintético TBHQ muestra la mayor capacidad para retardar la oxidación acelerada mediante el método Rancimat de las tres matrices alimentarias estudiadas, especialmente en el aceite de pescado (n-3). El grupo de los cinco RE constituye el segundo antioxidante más efectivo en todos los aceites, mostrando un efecto muy superior al resto de antioxidantes sintéticos estudiados y al extracto rico en tocoferoles, su principal competidor como antioxidante natural en la industria alimentaria. El grupo de los RE no muestra diferencias significativas en su capacidad para estabilizar las distintas naturalezas lipídicas (n-3, n-6 y n-9) de los aceites estudiados en esta memoria.
2. A pesar de la gran capacidad antirradicalaria frente al DPPH<sup>•</sup> mostrada por GSE y OE (Capítulo 2), ambos extractos muestran una menor capacidad para retardar la oxidación lipídica en los tres aceites ensayados. OE muestra una actividad superior que los antioxidantes sintéticos BHA, BHT y TOC en los tres aceites estudiados y presenta mayor efecto que AP en su capacidad para proteger GIR (n-9), pero no así para SEM (n-6) y PES (n-3). GSE no muestra capacidad alguna para estabilizar ninguno de los aceites estudiados. La naturaleza mayoritariamente polar de los principios activos antioxidantes presentes en estos extractos dificulta su disolución en la matriz lipídica, disminuyendo o anulando así la capacidad antioxidante de estos extractos. Son necesarios futuros estudios orientados a conseguir un incremento en la solubilidad de estos compuestos en lípidos.
3. Los resultados obtenidos del estudio de la posible influencia de la relación CA/COL sobre la actividad antilipoperoxidante del RE realizado en este capítulo parecen confirmar que el CA tiene una mayor actividad antioxidante que el COL y sugieren que la presencia de una cierta

proporción de COL, en un cierto rango de valores (ratio CA/COL: 2,0–6,0), genera un efecto antioxidante sinérgico sobre el CA. La presencia de COL parece mejorar la estabilidad oxidativa del CA, reduciendo así el valor de K en la cinética de degradación de CA, cuando el extracto actúa como antioxidante protegiendo frente a la oxidación lipídica.

### **III - CONCLUSIONES**



### III- CONCLUSIONES

1<sup>a</sup>. Respecto a los **extractos naturales ensayados como antioxidantes alimentarios**:

- Los cinco extractos de romero (RE) obtenidos a partir de un mismo lote de *Rosmarinus officinalis L* y muestran un contenido absoluto de diterpenos ácido carnósico (CA) más carnosol (COL) entre 4 y 80%, y una relación entre las concentraciones de ambos compuestos (ratio CA/COL) entre 0,4 y 15.
- Los extractos vegetales obtenidos a partir de semilla de uva (*Vitis vinifera*) (GSE) y aguas de vegetación del olivar (*Olea europea*) (OE), muestran un contenido absoluto del 90% de procianidinas y el 28% de hidroxitirosol, respectivamente.
- Los cuatro antioxidantes de origen sintético seleccionados presentaron una concentración de sus principios activos antioxidantes superior al 99%.

2<sup>a</sup>. En el estudio de la **capacidad antirradical frente al DPPH\***:

- Los cinco RE, junto con los extractos vegetales GSE y OE, muestran mejor capacidad antirradical que los antioxidantes sintéticos BHT, BHA, TBHQ, AP y el extracto natural de tocoferoles (TOC). Dentro de los antioxidantes sintéticos, el TBHQ es el que mejor capacidad antirradical presenta. El extracto natural TOC, principal competidor del RE en el mercado de los antioxidantes naturales, muestra la menor capacidad antirradical frente a DPPH\* de todos los antioxidantes estudiados en esta memoria.
- Respecto a la capacidad antirradical de los diterpenos CA y COL en los distintos RE, el CA presenta mayor capacidad antirradical frente a DPPH\* que el COL, pero los resultados sugieren que, la presencia de una cierta proporción de COL (en un rango estrecho de valores:

ratio CA/COL 2,5-3), muestra un efecto sinérgico sobre el CA, potenciando la actividad antirradical del RE.

- El estudio de la cinética de reacción de los antioxidantes frente al DPPH<sup>•</sup> confirma que, la práctica de medir la capacidad antirradical antes de que la reacción alcance la meseta, no ofrece una información realista a la hora de comparar la capacidad antirradical de distintas sustancias. En cuanto a la cinética de reacción de los distintos RE, el COL reacciona más rápidamente con el DPPH<sup>•</sup> que el CA.

3<sup>a</sup>. El **análisis de la composición lipídica por CGL las tres matrices alimentarias** ensayadas muestra un perfil lipídico rico en:

- ácidos grasos n-9 para el aceite de girasol alto oleico (GIR) (ácidos grasos mayoritarios: oleico y linoleico con 83 y 8% respectivamente);
- ácidos grasos n-6 para el aceite de semilla de uva (SEM) (ácidos grasos mayoritarios: linoleico y oleico con 69 y 18% respectivamente) y
- ácidos grasos n-3 para el aceite de pescado (PES) (ácidos grasos mayoritarios: docosahexaenoico, docosapentaenoico y eicosapentaenoico con 75, 10 y 7% respectivamente).

4<sup>a</sup>. En relación a los **ensayos de estabilidad realizados a 40°C y a corto/medio plazo**, se concluye que:

- En el aceite de girasol alto oleico almacenado a 40°C a corto y medio plazo, los extractos de romero (especialmente el RE5), el TBHQ y el AP son los antioxidantes más eficaces protegiendo frente a los productos de oxidación primaria. Otros antioxidantes naturales y los antioxidantes sintéticos muestran menor eficacia antioxidante medida como IP. Estas condiciones de almacenamiento no promueven la formación de productos de oxidación secundaria en cantidades muy significativas a corto plazo para poder valorar el efecto de los diferentes antioxidantes sobre ellos (IA). A medio plazo, se empieza a observar un aumento en los valores de IA, ligeramente

inhibido por AP, BHT, TOC y RE3. El escaso incremento de IA, conlleva a que la capacidad de protección total (Totox) coincida con la eficacia antioxidante medida como IP. En estas condiciones, no es posible establecer de forma suficientemente sólida una relación estructura-actividad antioxidante vs hidroperóxidos de ácidos grasos n-6 en las condiciones del estudio. Las consideraciones principales desde el punto de vista estructural, en relación con la capacidad de protección del GIR en las condiciones indicadas, serían: la presencia simultánea de la estructura  $-O-[C=O]-$  (estructura éster-ácido carboxílico) y la de un grupo catecol o de una estructura tipo orto-dihidroxi.

- En el aceite de semilla de uva almacenado a 40°C a corto plazo, el TBHQ, RE5 y AP son los antioxidantes más eficaces protegiendo frente a los productos de oxidación primarios, y el TBHQ seguido de GSE, RE3 y AP a medio plazo. Otros antioxidantes naturales y sintéticos muestran menor eficacia medida como IP. Estas condiciones de almacenamiento no promueven la formación de productos secundarios de oxidación en cantidades significativas para poder valorar el efecto de los diferentes antioxidantes sobre ellos (IA), por lo que la capacidad de protección total (Totox) coincide con la eficacia antioxidante medida como IP. En estas condiciones, no ha sido posible establecer de forma suficientemente sólida una relación estructura-actividad antioxidante vs hidroperóxidos de ácidos grasos n-6 en las condiciones del estudio.
- En el aceite de pescado almacenado a 40°C a corto plazo, los productos primarios de oxidación disminuyen en mayor grado con el uso de RE4, RE5, BHT y GSE mostrando el TBHQ una escasa actividad antioxidante en esta matriz alimentaria. A medio plazo, estos productos de oxidación primarios formados van desapareciendo en el tiempo al transformarse en productos de oxidación secundarios, por lo que con los datos obtenidos para el parámetro IP, no es posible establecer de forma suficientemente sólida una relación estructura-actividad antioxidante vs

hidroperóxidos de ácidos grasos n-3 en las condiciones del estudio. No se aprecia en ninguno de los productos ensayados capacidad antioxidante frente a los productos de oxidación secundaria en el aceite de pescado almacenado a corto plazo a 40°C. Sin embargo, a medio plazo, aunque todos los antioxidantes muestran actividad, los extractos naturales TOC y GSE ponen de manifiesto el mayor poder antioxidante frente a estos productos de oxidación secundarios, seguidos de RE3 y RE4, siendo TBHQ y BHT muy poco eficaces en estas condiciones. Los datos obtenidos en esta fase de estudio para el valor Totox en el aceite de pescado no son representativos de la oxidación total.

5ª. En relación a los **ensayos de estabilidad realizados a 60°C y a corto/medio plazo**, se concluye que:

- Las experiencias realizadas sobre el aceite de girasol alto oleico muestran que solo cuatro extractos de romero (RE3, RE5, RE2 y RE4) manifiestan capacidad antioxidante frente a los productos de oxidación primarios (IP). Siendo TBHQ y RE3 los más eficaces para reducir la oxidación secundaria (IA), mientras que los antioxidantes naturales TOC, GSE y OE no muestran actividad.
- En el aceite de semilla de uva, solo RE5 disminuye significativamente los productos de oxidación primarios (IP), mientras que BHA, GSE y RE3 logran una mayor disminución de los productos de oxidación secundarios (IA).
- En el aceite de pescado se produce un pronunciado incremento de productos de oxidación secundarios, procedentes de la descomposición de hidroperóxidos, lo que se cuantifica como una disminución a lo largo del tiempo en los valores del IP y un incremento del IA. TBHQ, seguido de los extractos de romero RE1, RE2, RE3 y RE5 son los compuestos que presentaron mayor actividad en la reducción compuestos carbonilo. El resto de los antioxidantes naturales ensayados (RE4, TOC, GSE y OE) no muestran ninguna capacidad para disminuir el IA. Esta distribución en los datos no

permite realizar ningún tipo de análisis de relación estructura-actividad antioxidante.

6<sup>a</sup>. Respecto al **efecto de la ratio ácido carnósico/carnosol sobre la capacidad antilipoperoxidante de los productos ensayados sobre las matrices almacenadas a 40°C y 60°C**, se concluye que:

- En los aceites de girasol alto oleico y de semilla de uva, el mayor contenido en CA se relaciona con una mayor actividad antioxidante respecto al COL sobre la disminución de formación de productos de oxidación primarios, pero no en el efecto sobre la formación de productos de oxidación secundarios. No se puede definir en estas condiciones una ratio CA/COL óptima para desarrollar la capacidad antioxidante.
- Sin embargo, en la matriz alimentaria aceite de pescado se observan resultados muy diferentes ya que, durante el almacenamiento de este aceite a 40°C se aprecia que una ratio CA/COL en torno a 5,0-5,5-6 muestra una cierta sinergia antioxidante respecto a la disminución de productos de oxidación primaria y secundaria.

7<sup>a</sup>. El **estudio de capacidad antilipoperoxidante mediante el método de oxidación acelerada Rancimat** mostró que:

- TBHQ es el antioxidante que muestra mejor capacidad estabilizadora frente a la oxidación lipídica en los tres aceites estudiados, siendo esta especialmente pronunciada en el aceite de pescado, rico en n-3. El Segundo bloque antioxidante más efectivo en todos los aceites está constituido por los cinco RE que muestran un efecto muy superior al resto de los antioxidantes estudiados. Los RE no muestran diferencias significativas en su capacidad para proteger las distintas naturalezas lipídicas (n-3, n-6 y n-9) estudiadas en esta memoria.
- Los resultados obtenidos para los distintos RE confirman que el CA muestra mejor capacidad para retardar la oxidación lipídica que el COL y sugieren que, la presencia de una cierta proporción de COL

(en un rango de valores de ratio CA/COL en torno a 2,0-6,0), genera un efecto antioxidante sinérgico sobre CA. La presencia de COL parece mejorar la estabilidad oxidativa del CA, reduciendo así el valor K en la cinética de degradación de CA, cuando el extracto actúa como antioxidante protegiendo frente a la oxidación lipídica.

- El extracto OE mostró una capacidad superior que antioxidantes BHA, BHT y TOC en los tres aceites estudiados y compite con AP, mostrando mayor efecto que este para proteger GIR (n-9), pero no así para SEM (n-6) y PES (n-3). EL extracto GSE no mostró capacidad alguna para estabilizar ninguno de los aceites estudiados.

## **IV- ANEXOS**



**ANEXO 4.1.** Datos de los valores de IP, IA y TOTOX obtenidos para las muestras de aceite de girasol alto oleico en la prueba de estabilidad a 40°C.

Evolución IP-Estabilidad a 40°C - Aceite de girasol alto oleico							
	0 d	7 d	14 d	21 d	28 d	35 d	150 d
BLANCO	3,30 ±0,04	3,81 ±0,01	4,92 ±0,01	7,73 ±0,28	8,39 ±0,20	14,87 ±0,30	68,94 ±1,04
BHT		3,71 ±0,08	4,24 ±0,08	5,33 ±0,11	11,09 ±0,68	16,26 ±0,11	48,16 ±2,11
BHA		3,47 ±0,13	5,08 ±0,00	7,04 ±0,53	10,34 ±0,29	15,56 ±0,04	62,18 ±2,72
TBHQ		2,97 ±0,13	3,07 ±0,11	4,01 ±0,32	7,24 ±0,50	6,34 ±0,40	54,45 ±0,72
AP		3,95 ±0,16	5,13 ±0,22	6,74 ±0,41	6,21 ±0,44	6,33 ±0,50	44,42 ±1,42
RE1		3,68 ±0,06	4,67 ±0,16	5,42 ±0,27	7,88 ±0,41	11,23 ±0,95	41,24 ±2,13
RE2		3,47 ±0,03	4,27 ±0,30	4,72 ±0,08	5,19 ±0,15	9,81 ±0,51	37,41 ±1,48
RE3		3,56 ±0,26	4,03 ±0,21	5,56 ±0,01	7,75 ±0,17	7,84 ±0,09	39,70 ±1,34
RE4		3,19 ±0,13	3,74 ±0,13	5,06 ±0,03	7,74 ±0,12	11,37 ±0,84	55,57 ±0,09
RE5		2,89 ±0,05	3,85 ±0,16	4,06 ±0,31	4,53 ±0,11	7,25 ±0,19	34,15 ±1,25
TOC		3,16 ±0,21	5,10 ±0,08	8,39 ±0,65	8,31 ±0,07	9,38 ±0,22	64,53 ±0,76
GSE		3,23 ±0,25	5,10 ±0,26	8,72 ±0,54	9,06 ±0,15	13,52 ±0,43	60,20 ±1,81
OE		3,37 ±0,27	5,54 ±0,10	8,30 ±0,29	7,25 ±0,30	16,09 ±0,34	58,45 ±2,86

Resultados de índice de peróxidos (IP) expresados en meq O<sub>2</sub>/Kg grasa como media ±SD (n=3). Tiempo expresado en días (d).

	Evolución IA-Estabilidad a 40°C - Aceite de girasol alto oleico						
	0 d	7 d	14 d	21 d	28 d	35 d	150 d
BLANCO	1,00 ±0,04	0,88 ±0,06	0,95 ±0,00	1,29 ±0,00	1,08 ±0,00	1,36 ±0,07	2,75 ±0,72
BHT		0,92 ±0,04	0,99 ±0,01	1,03 ±0,05	1,09 ±0,08	1,54 ±0,12	1,64 ±0,01
BHA		0,90 ±0,08	0,98 ±0,01	1,12 ±0,01	0,89 ±0,01	1,51 ±0,05	2,43 ±0,00
TBHQ		0,88 ±0,07	0,93 ±0,01	1,11 ±0,01	0,99 ±0,07	1,27 ±0,05	2,07 ±0,02
AP		0,60 ±0,03	0,93 ±0,04	1,11 ±0,02	1,19 ±0,01	1,28 ±0,00	1,61 ±0,03
RE1		0,95 ±0,04	1,31 ±0,01	1,39 ±0,04	1,47 ±0,08	1,57 ±0,05	2,19 ±0,01
RE2		0,90 ±0,06	1,00 ±0,04	0,92 ±0,05	1,18 ±0,04	1,47 ±0,00	2,13 ±0,04
RE3		0,96 ±0,08	1,02 ±0,02	1,29 ±0,01	1,32 ±0,02	1,41 ±0,01	1,74 ±0,09
RE4		0,89 ±0,03	0,94 ±0,03	1,14 ±0,03	1,42 ±0,01	1,39 ±0,03	2,30 ±0,11
RE5		0,88 ±0,04	0,97 ±0,01	0,90 ±0,00	1,06 ±0,02	1,19 ±0,00	2,04 ±0,06
TOC		0,99 ±0,05	1,17 ±0,03	1,00 ±0,03	0,95 ±0,00	0,98 ±0,06	1,70 ±0,01
GSE		0,91 ±0,05	1,09 ±0,00	1,02 ±0,04	0,92 ±0,09	1,70 ±0,01	2,73 ±0,17
OE		0,96 ±0,08	1,12 ±0,01	1,00 ±0,01	1,07 ±0,09	1,42 ±0,01	2,57 ±0,06

Resultados de índice de p-anisidina (IA) expresados como media  $\pm$ SD (n=3). Tiempo expresado en días (d).

Evolución TOTOX-Estabilidad a 40°C - Aceite de girasol alto oleico							
	0 d	7 d	14 d	21 d	28 d	35 d	150 d
BLANCO	7,60 ±0,12	8,51 ±0,04	10,78 ±0,01	16,75 ±0,56	17,86 ±0,39	31,10 ±0,53	140,62 ±1,82
BHT		8,34 ±0,20	9,46 ±0,15	11,69 ±0,27	23,27 ±1,33	34,07 ±0,12	97,95 ±4,22
BHA		7,84 ±0,20	11,14 ±0,01	15,21 ±1,07	21,58 ±0,57	32,63 ±0,12	126,79 ±5,43
TBHQ		6,83 ±0,24	7,07 ±0,22	9,13 ±0,63	15,48 ±0,92	13,95 ±0,78	110,97 ±1,46
AP		8,51 ±0,30	11,20 ±0,48	14,59 ±0,81	13,61 ±0,88	13,93 ±0,99	90,45 ±2,86
RE1		8,30 ±0,14	10,65 ±0,33	12,22 ±0,50	17,24 ±0,85	24,04 ±1,93	84,67 ±4,26
RE2		7,83 ±0,05	9,53 ±0,60	10,37 ±0,20	11,56 ±0,35	21,09 ±1,03	76,96 ±3,00
RE3		8,09 ±0,59	9,08 ±0,40	12,42 ±0,01	16,81 ±0,36	17,09 ±0,18	81,14 ±2,71
RE4		7,28 ±0,27	8,43 ±0,23	11,26 ±0,04	16,90 ±0,22	24,13 ±1,66	113,45 ±0,29
RE5		6,67 ±0,13	8,68 ±0,31	9,02 ±0,61	10,12 ±0,25	15,70 ±0,38	70,34 ±2,53
TOC		7,31 ±0,44	11,37 ±0,13	17,79 ±1,29	17,57 ±0,13	19,73 ±0,38	130,76 ±1,53
GSE		7,37 ±0,50	11,30 ±0,52	18,46 ±1,12	19,05 ±0,39	28,73 ±0,85	123,12 ±3,78
OE		7,71 ±0,47	12,20 ±0,21	17,60 ±0,60	15,57 ±0,50	33,61 ±0,66	119,46 ±5,77

Resultados de oxidación total (TOTOX) expresados como media ±SD (n=3). Tiempo expresado en días (d).

**ANEXO 4.2.** Datos de los valores de IP, IA y TOTOX obtenidos para las muestras de aceite de semilla de uva en la prueba de estabilidad a 40°C.

	Evolución IP-Estabilidad a 40°C - Aceite de semilla de uva						
	0 d	7 d	14 d	21 d	28 d	35 d	150 d
BLANCO	3,07 ±0,09	4,22 ±0,18	5,19 ±0,13	7,23 ±0,16	16,59 ±0,36	17,53 ±0,15	48,73 ±1,90
BHT	3,90 ±0,09	3,90 ±0,09	5,13 ±0,02	7,25 ±0,09	14,88 ±0,19	17,76 ±0,84	51,69 ±0,42
BHA	3,68 ±0,27	3,68 ±0,27	4,78 ±0,10	8,20 ±0,25	18,14 ±1,18	19,67 ±0,67	51,31 ±0,04
TBHQ	3,27 ±0,13	3,27 ±0,13	4,17 ±0,06	4,46 ±0,25	6,32 ±0,42	8,62 ±0,30	30,11 ±1,11
AP	3,34 ±0,20	3,34 ±0,20	4,33 ±0,16	5,46 ±0,35	7,94 ±0,21	9,22 ±0,07	40,85 ±1,44
RE1	3,91 ±0,23	3,91 ±0,23	5,61 ±0,08	7,38 ±0,16	10,04 ±0,13	12,04 ±0,12	45,47 ±1,54
RE2	3,68 ±0,05	3,68 ±0,05	5,46 ±0,27	7,34 ±0,39	8,60 ±0,14	8,72 ±0,33	47,03 ±1,98
RE3	3,35 ±0,05	3,35 ±0,05	5,24 ±0,03	6,90 ±0,30	8,97 ±0,50	8,73 ±0,49	40,65 ±0,22
RE4	3,92 ±0,13	3,92 ±0,13	5,36 ±0,09	7,96 ±0,20	8,96 ±0,12	10,96 ±0,24	49,57 ±0,80
RES	3,66 ±0,08	3,66 ±0,08	5,05 ±0,01	6,92 ±0,03	8,13 ±0,25	6,29 ±0,30	45,00 ±0,97
TOC	3,41 ±0,20	3,41 ±0,20	5,72 ±0,22	8,23 ±0,39	17,97 ±0,46	16,97 ±0,24	49,36 ±1,18
GSE	3,87 ±0,22	3,87 ±0,22	6,21 ±0,32	9,13 ±0,26	13,25 ±0,64	12,29 ±0,09	39,25 ±1,96
OE	3,57 ±0,14	3,57 ±0,14	5,28 ±0,10	8,48 ±0,06	15,90 ±0,06	17,42 ±0,33	43,83 ±0,52

Resultados de índice de peróxidos (IP) expresados en meq O<sub>2</sub>/Kg grasa como media ±SD (n=3). Tiempo expresado en días (d).

Evolución IA-Estabilidad a 40°C - Aceite de semilla de uva							
	0 d	7 d	14 d	21 d	28 d	35 d	150 d
BLANCO	9,79 ±0,16	9,85 ±0,43	9,57 ±0,09	9,15 ±0,01	9,44 ±0,06	9,77 ±0,13	11,73 ±0,02
BHT		9,93 ±0,15	9,73 ±0,10	9,53 ±0,02	9,28 ±0,04	9,59 ±0,21	12,52 ±0,79
BHA		9,55 ±0,37	9,87 ±0,07	9,64 ±0,12	9,91 ±0,55	9,58 ±0,12	12,46 ±0,19
TBHQ		9,15 ±0,20	9,72 ±0,02	9,77 ±0,18	8,79 ±0,36	9,09 ±0,10	10,23 ±0,38
AP		9,37 ±0,08	9,69 ±0,01	9,65 ±0,44	9,11 ±0,10	9,38 ±0,02	11,85 ±0,61
RE1		10,67 ±0,37	10,23 ±0,32	9,39 ±0,00	9,64 ±0,34	9,75 ±0,03	12,94 ±0,26
RE2		9,11 ±0,23	10,08 ±0,01	9,36 ±0,24	9,32 ±0,14	9,30 ±0,09	11,57 ±0,28
RE3		10,41 ±0,36	9,67 ±0,07	10,01 ±0,16	9,39 ±0,11	9,76 ±0,07	12,34 ±0,27
RE4		9,56 ±0,55	9,27 ±0,14	10,17 ±0,12	9,54 ±0,08	9,61 ±0,07	11,90 ±0,29
RE5		9,13 ±0,03	9,30 ±0,07	10,21 ±0,01	9,32 ±0,03	9,88 ±0,14	11,95 ±0,74
TOC		9,75 ±0,56	10,04 ±0,08	10,32 ±0,03	10,02 ±0,01	9,92 ±0,08	12,48 ±0,31
GSE		10,63 ±0,34	9,70 ±0,09	9,95 ±0,02	10,24 ±0,07	9,88 ±0,18	11,42 ±0,24
OE		9,96 ±0,54	9,72 ±0,06	10,46 ±0,29	10,00 ±0,05	10,00 ±0,19	12,19 ±0,70

Resultados de índice de p-anisidina expresados como media ±SD (n=3). Tiempo expresado en días (d).

	Evolución TOTOX-Estabilidad a 40°C - Aceite de semilla de uva						
	0 d	7 d	14 d	21 d	28 d	35 d	150 d
BLANCO	15,93 ±0,03	18,30 ±0,40	19,96 ±0,17	23,60 ±0,33	42,61 ±0,78	44,83 ±0,16	109,20 ±3,80
BHT		17,73 ±0,16	20,00 ±0,06	24,04 ±0,16	39,04 ±0,33	45,11 ±1,58	115,89 ±0,61
BHA		16,91 ±0,91	19,44 ±0,27	26,03 ±0,44	46,20 ±2,92	48,91 ±1,29	115,07 ±0,16
TBHQ		15,69 ±0,14	18,05 ±0,10	18,70 ±0,43	21,43 ±0,72	26,33 ±0,55	70,45 ±1,97
AP		16,05 ±0,45	18,35 ±0,31	20,58 ±0,61	25,00 ±0,37	27,82 ±0,13	93,54 ±3,24
RE1		18,50 ±0,64	21,45 ±0,49	24,15 ±0,32	29,71 ±0,60	33,84 ±0,27	103,88 ±2,90
RE2		16,47 ±0,20	20,99 ±0,53	24,03 ±0,53	26,53 ±0,41	26,75 ±0,72	105,63 ±3,73
RE3		17,11 ±0,41	20,14 ±0,13	23,81 ±0,77	27,33 ±1,11	27,22 ±1,01	93,64 ±0,70
RE4		17,41 ±0,79	19,99 ±0,04	26,08 ±0,52	27,47 ±0,16	31,54 ±0,52	111,04 ±1,31
RE5		16,44 ±0,16	19,41 ±0,09	24,05 ±0,08	25,57 ±0,52	22,46 ±0,75	101,95 ±2,25
TOC		16,56 ±0,66	21,48 ±0,52	26,78 ±0,76	45,97 ±0,93	43,86 ±0,44	111,19 ±2,36
GSE		18,36 ±0,40	22,13 ±0,61	28,20 ±0,50	36,74 ±1,21	34,45 ±0,37	89,91 ±4,17
OE		17,11 ±0,54	20,27 ±0,25	27,41 ±0,42	41,80 ±0,17	44,83 ±0,86	99,86 ±0,96

Resultados de oxidación total (TOTOX) expresados como media ±SD (n=3). Tiempo expresado en días (d).

**ANEXO 4.3.** Datos de los valores de IP, IA y TOTOX obtenidos para las muestras de aceite de pescado en la prueba de estabilidad a 40°C.

Evolución IP-Estabilidad a 40°C - Aceite de pescado									
	0 d	7 d	14 d	21 d	28 d	35 d	150 d		
BLANCO	6,48 ±0,25	8,36 ±0,37	6,75 ±0,50	9,59 ±0,27	7,22 ±0,08	8,86 ±0,03	2,60 ±0,05		
BHT		7,62 ±0,27	8,34 ±0,00	6,32 ±0,15	6,01 ±0,13	5,24 ±0,12	2,91 ±0,02		
BHA		9,23 ±0,33	7,15 ±0,14	9,14 ±0,05	7,13 ±0,05	5,56 ±0,25	2,82 ±0,03		
TBHQ		7,90 ±0,11	9,62 ±0,34	9,71 ±0,02	8,26 ±0,02	6,85 ±0,06	2,43 ±0,06		
AP		8,38 ±0,30	7,12 ±0,41	9,05 ±0,35	8,48 ±0,08	7,17 ±0,16	2,42 ±0,06		
RE1		9,64 ±0,21	8,14 ±0,01	9,02 ±0,23	7,79 ±0,09	6,67 ±0,21	2,04 ±0,03		
RE2		9,78 ±0,31	9,16 ±0,22	10,29 ±0,11	7,49 ±0,42	6,55 ±0,01	2,10 ±0,08		
RE3		9,96 ±0,40	8,71 ±0,13	8,26 ±0,28	7,06 ±0,00	5,72 ±0,25	2,20 ±0,02		
RE4		7,30 ±0,42	4,92 ±0,18	5,71 ±0,05	5,21 ±0,20	4,47 ±0,25	1,44 ±0,04		
RE5		9,29 ±0,02	5,97 ±0,03	6,34 ±0,09	5,74 ±0,23	6,70 ±0,08	2,03 ±0,02		
TOC		9,10 ±0,10	8,31 ±0,21	9,43 ±0,08	6,64 ±0,12	6,90 ±0,06	2,05 ±0,08		
GSE		8,33 ±0,39	6,11 ±0,23	6,75 ±0,08	6,55 ±0,35	6,39 ±0,08	3,16 ±0,14		
OE		9,43 ±0,03	6,03 ±0,36	7,54 ±0,19	7,47 ±0,19	9,50 ±0,35	2,89 ±0,04		

Resultados de índice de peróxidos (IP) expresados en meq O<sub>2</sub>/Kg grasa como media ±SD (n=3). Tiempo expresado en días (d).

Evolución IA-Estabilidad a 40°C - Aceite de pescado

	0 d	7 d	14 d	21 d	28 d	35 d	150 d
BLANCO	17,96 ±0,27	25,86 ±0,04	23,18 ±0,34	26,02 ±0,00	23,45 ±0,11	28,39 ±0,05	36,98 ±0,18
BHT		23,61 ±0,01	22,90 ±0,12	23,66 ±0,06	24,34 ±0,15	23,73 ±0,13	37,26 ±0,27
BHA		21,83 ±0,16	21,96 ±0,12	24,85 ±0,19	25,33 ±0,02	24,99 ±0,12	33,10 ±0,21
TBHQ		21,74 ±0,02	25,60 ±0,06	25,41 ±0,08	26,33 ±0,23	26,97 ±0,26	36,73 ±0,29
AP		22,71 ±0,12	23,12 ±0,07	24,35 ±0,11	25,26 ±0,08	25,48 ±0,43	32,02 ±0,54
RE1		22,92 ±0,38	23,76 ±0,32	25,50 ±0,08	25,87 ±0,02	26,33 ±0,00	32,17 ±0,26
RE2		22,40 ±0,14	23,32 ±0,10	25,45 ±0,08	24,23 ±0,31	25,20 ±0,13	34,17 ±0,30
RE3		22,88 ±0,32	21,13 ±0,15	24,72 ±0,28	24,54 ±0,08	24,95 ±0,46	31,18 ±0,35
RE4		21,41 ±0,06	21,93 ±0,39	24,79 ±1,04	23,82 ±0,09	26,54 ±0,33	31,56 ±0,43
RE5		21,73 ±0,01	23,22 ±0,50	22,82 ±0,73	24,66 ±0,16	26,21 ±0,10	34,70 ±0,17
TOC		22,21 ±0,04	22,78 ±0,35	25,08 ±0,31	24,07 ±0,02	25,81 ±0,25	29,72 ±0,17
GSE		23,32 ±0,11	22,14 ±0,01	23,39 ±0,03	24,72 ±1,44	26,15 ±0,27	30,15 ±0,14
OE		24,52 ±0,49	23,00 ±0,28	25,82 ±0,76	25,07 ±0,03	31,24 ±0,03	34,34 ±0,28

Resultados de índice de p-antioxidina expresados como media ±SD (n=3). Tiempo expresado en días (d).

Evolución TOIX-Estabilidad a 40°C - Aceite de pescado

	0 d	7 d	14 d	21 d	28 d	35 d	150 d
BLANCO	30,93 ±0,59	42,58 ±0,77	36,69 ±0,89	45,20 ±0,54	37,90 ±0,28	46,11 ±0,01	42,18 ±0,25
BHT		38,85 ±0,56	39,59 ±0,13	36,30 ±0,36	36,36 ±0,12	34,22 ±0,11	43,07 ±0,23
BHA		40,29 ±0,62	36,25 ±0,39	43,14 ±0,08	39,60 ±0,07	36,11 ±0,61	38,74 ±0,16
TBHQ		37,53 ±0,24	44,84 ±0,75	44,84 ±0,04	42,85 ±0,18	40,67 ±0,38	41,58 ±0,41
AP		39,48 ±0,73	37,37 ±0,89	42,45 ±0,59	42,22 ±0,09	39,81 ±0,74	36,87 ±0,67
RE1		42,20 ±0,79	40,04 ±0,29	43,54 ±0,38	41,46 ±0,16	39,67 ±0,43	36,26 ±0,31
RE2		41,96 ±0,72	41,63 ±0,34	46,03 ±0,14	39,20 ±0,53	38,30 ±0,15	38,37 ±0,45
RE3		42,80 ±0,82	38,55 ±0,11	41,24 ±0,29	38,66 ±0,08	36,39 ±0,60	35,57 ±0,38
RE4		36,01 ±0,84	31,77 ±0,38	36,20 ±1,14	34,24 ±0,48	35,48 ±0,51	34,43 ±0,35
RE5		40,32 ±0,03	35,16 ±0,43	35,51 ±0,62	36,14 ±0,63	39,60 ±0,25	38,77 ±0,21
TOC		40,41 ±0,23	39,41 ±0,76	43,95 ±0,15	37,35 ±0,26	39,62 ±0,27	33,83 ±0,33
GSE		39,98 ±0,88	34,37 ±0,47	36,88 ±0,12	37,82 ±2,08	38,92 ±0,34	36,46 ±0,13
OE		43,39 ±0,55	35,06 ±1,01	40,90 ±1,15	40,00 ±0,38	50,25 ±0,67	40,13 ±0,21

Resultados de oxidación total (TOIX) expresados como media ±SD (n=3). Tiempo expresado en días (d).

**ANEXO 4.4.** Datos de los valores de IP e IA obtenidos para las muestras de aceite de girasol alto oleico, aceite de semilla de uva y aceite de pescado en la prueba de estabilidad a 60°C.

	Evolución IP e IA-Estabilidad a 60°C - Aceite de girasol alto oleico			
	IP		IA	
	0 d	35 d	0 d	35 d
<b>BLANCO</b>	15,07 ±0,32	18,22 ±0,79	1,42 ±0,07	6,72 ±0,20
<b>BHT</b>		17,16 ±0,37		6,07 ±0,25
<b>BHA</b>		18,51 ±0,37		6,37 ±0,46
<b>TBHQ</b>		18,61 ±0,43		3,02 ±0,23
<b>AP</b>		18,59 ±1,05		5,77 ±0,26
<b>RE1</b>		17,16 ±1,23		5,10 ±0,30
<b>RE2</b>		16,10 ±0,46		5,95 ±0,15
<b>RE3</b>		16,31 ±0,35		4,66 ±0,18
<b>RE4</b>		16,02 ±0,34		5,35 ±0,24
<b>RE5</b>		16,17 ±0,42		5,39 ±0,20
<b>TOC</b>		17,51 ±0,19		7,33 ±0,35
<b>GSE</b>		20,45 ±0,58		6,42 ±0,38
<b>OE</b>		17,64 ±0,23		7,06 ±0,19

Resultados de índice de peróxidos (IP) e índice de p-anisidina (IA) expresados como media ±SD (n=3). Tiempo expresado en días (d).

	Evolución IP e IA-Estabilidad a 60°C - Aceite de semilla de uva			
	IP		IA	
	0 d	35 d	0 d	35 d
BLANCO	17,87 ±0,32	23,67 ±0,69	9,90 ±0,31	15,38 ±0,36
BHT		23,69 ±0,84		13,72 ±0,18
BHA		23,82 ±0,32		12,72 ±0,44
TBHQ		22,28 ±0,78		14,42 ±0,54
AP		22,46 ±0,62		15,89 ±0,54
RE1		23,06 ±0,70		15,14 ±0,21
RE2		22,31 ±0,62		14,31 ±0,31
RE3		22,31 ±0,45		13,01 ±0,42
RE4		22,87 ±0,47		16,07 ±0,29
RE5		21,27 ±0,32		14,36 ±0,35
TOC		23,63 ±0,36		15,96 ±0,44
GSE		23,10 ±0,24		12,86 ±0,20
OE		23,66 ±1,04		14,25 ±0,37

Resultados de índice de peróxidos (IP) e índice de p-anisidina (IA) expresados como media ±SD (n=3). Tiempo expresado en días (d).

	Evolución IP e IA-Estabilidad a 60°C - Aceite de pescado			
	IP		IA	
	0 d	35 d	0 d	35 d
BLANCO	8,70 ±0,23	3,47 ±0,17	28,80 ±0,16	46,62 ±1,36
BHT		3,70 ±0,23		43,59 ±1,06
BHA		3,40 ±0,14		44,62 ±0,61
TBHQ		3,60 ±0,13		40,53 ±0,80
AP		3,70 ±0,32		46,25 ±0,88
RE1		3,90 ±0,15		41,16 ±1,07
RE2		4,05 ±0,12		42,35 ±0,33
RE3		3,80 ±0,11		41,68 ±0,56
RE4		4,15 ±0,26		45,20 ±1,03
RE5		3,80 ±0,16		41,36 ±1,29
TOC		3,60 ±0,26		45,61 ±0,54
GSE		3,90 ±0,27		45,12 ±0,44
OE		3,70 ±0,26		47,06 ±0,62

Resultados de índice de peróxidos (IP) e índice de p-anisidina (IA) expresados como media ±SD (n=3). Tiempo expresado en días (d).



## V- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS



## V-REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Abidi, S. L., & Rennick, K. A. (2003). Determination of nonvolatile components in polar fractions of rice bran oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 80(11), 1057-1062.
- Ahmed, M., Pickova, J., Ahmad, T., Liaquat, M., Farid, A., & Jahangir, M. (2016). Oxidation of Lipids in Foods. *Sarhad Journal of Agriculture*, 32(3), 230-238.
- Ahn, J.-H., Kim, Y.-P., Seo, E.-M., Choi, Y.-K., & Kim, H.-S. (2008). Antioxidant effect of natural extracts on the microencapsulated high oleic sunflower oil. *Journal of Food Engineering*, 84, 327-334.
- Aksu, M. İ., & Kaya, M. (2005). The effect of  $\alpha$ -tocopherol and butylated hydroxyanisole on the colour properties and lipid oxidation of kavurma, a cooked meat product. *Meat Science*, 71(2), 277-283.
- Ali, M. A., Najmaldien, A. H. A., Latip, R. A., Othman, N. H., Majid, F. A. A., & Salleh, L. M. (2013). Effect of heating at frying temperature on the quality characteristics of regular and high-oleic acid sunflower oils. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 12(2), 159-167.
- Alizadeh, L., Nayebzadeh, K., & Mohammadi, A. (2016). A comparative study on the in vitro antioxidant activity of tocopherol and extracts from rosemary and *Ferulago angulata* on oil oxidation during deep frying of potato slices. *Journal of Food Science and Technology*, 53(1), 611-620.
- Allemann, I. B., & Baumann, L. (2008). Antioxidants used in skin care formulations. *Skin therapy letter*, 13(7), 5-9.
- Amouroux, P., Jean, D., & Lamaison, J. L. (1998). The effect of the formulation of a skin cream with a procyanidin polymer base and its effect on skin lesions caused by herpesviruses. *Journal De Pharmacie De Belgique*, 53(1), 24-30.

- Anastasiadi, M., Chorianopoulos, N. G., Nychas, G.-J. E., & Haroutounian, S. A. (2009). Antilisterial activities of polyphenol-rich extracts of grapes and vinification byproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*(2), 457-463
- AOCS. (1997). AOCS Official Method Cd 12b-92. Oil Stability Index. En *Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society (6th ed.)*. Champaign, IL, USA: AOCS Press.
- AOCS. (2003). Official Method Cd 8-53. Peroxide Value—Acetic Acid-Chloroform Method. En *Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society (6th ed.)*. Champaign, IL, USA: AOCS Press.
- AOCS. (2009a). Official Method AOCS Cd 18-90. P-Anisidine Value. En *Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society (6th ed.)*. Champaign, IL, USA: AOCS Press.
- AOCS. (2009b). Official Method Ce 1i-07. Saturated, cis-Monounsaturated, and cis-Polyunsaturated Fatty Acids in Marine and Other Oils Containing Long Chain Polyunsaturated Fatty Acids (PUFAs) by Capillary GLC. En *Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society (6th ed.)*. Champaign, IL, USA: AOCS Press.
- Aruoma, O. I., Halliwell, B., Aeschbach, R., & Löliger, J. (1992). Antioxidant and pro-oxidant properties of active rosemary constituents: Carnosol and carnosic acid. *Xenobiotica*, *22*(2), 257-268.
- Ashton, E. L., Best, J. D., & Ball, M. J. (2001). Effects of monounsaturated enriched sunflower oil on CHD risk factors including LDL size and copper-induced LDL oxidation. *Journal of the American College of Nutrition*, *20*(4), 320-326.
- Auñon-Calles, D., Canut, L., & Visioli, F. (2013). Toxicological evaluation of pure hydroxytyrosol. *Food and Chemical Toxicology*, *55*, 498-504.
- Babich, H., & Visioli, F. (2003). In vitro cytotoxicity to human cells in culture of some phenolics from olive oil. *Il Farmaco*, *58*(5), 403-407.

- Balzan, S., Taticchi, A., Cardazzo, B., Urbani, S., Servili, M., Di Lecce, G., ... Fasolato, L. (2017). Effect of phenols extracted from a by-product of the oil mill on the shelf-life of raw and cooked fresh pork sausages in the absence of chemical additives. *LWT - Food Science and Technology*, *85*, 89-95.
- Basaga, H., Tekkaya, C., & Acikel, F. (1997). Antioxidative and free radical scavenging properties of rosemary extract. *LWT-Food Science and Technology*, *30*(1), 105–108.
- Beck, M., Bruchlen, M., Schäfer, K., & Mair, P. (2014). In vitro hydrolysis of ascorbyl palmitate in simulated intestinal fluid. Unpublished study report submitted by DSM following suggestions from EFSA. *EFSA Journal* *13*(11):4289.
- Benavente-Garcia, O., Castillo, J., Lorente, J., Ortuno, A., & Del Rio, J. A. (2000). Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food Chemistry*, *68*(4), 457–462.
- Bendif, H., Boudjeniba, M., Djamel Miara, M., Biqiku, L., Bramucci, M., Caprioli, G., ... Maggi, F. (2017). *Rosmarinus eriocalyx*: An alternative to *Rosmarinus officinalis* as a source of antioxidant compounds. *Food Chemistry*, *218*, 78-88.
- Bentivegna, S. S., & Whitney, K. M. (2002). Subchronic 3-month oral toxicity study of grape seed and grape skin extracts. *Food and Chemical Toxicology*, *40*(12), 1731-1743.
- Bernini, R., Merendino, N., Romani, A., & Velotti, F. (2013). Naturally occurring hydroxytyrosol: Synthesis and anticancer potential. *Current Medicinal Chemistry*, *20*(5), 655-670.
- Birtić, S., Dussort, P., Pierre, F.-X., Bily, A. C., & Roller, M. (2015). Carnosic acid. *Phytochemistry*, *115*, 9-19.
- Bombardelli, E., & Morazzoni, P. (1995). *Vitis vinifera* L. *Fitoterapia*, *66*(4), 291-317.
- Boskou, D. (2008). *Olive Oil: Minor Constituents and Health*. Boca Raton, Florida: CRC Press.

- Böttcher, S., Steinhäuser, U., & Drusch, S. (2015). Off-flavour masking of secondary lipid oxidation products by pea dextrin. *Food Chemistry*, *169*, 492-498.
- Botterweck, A. A., Verhagen, H., Goldbohm, R. A., Kleinjans, J., & van den Brandt, P. A. (2000). Intake of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene and stomach cancer risk: Results from analyses in the Netherlands Cohort Study. *Food and Chemical Toxicology*, *38*(7), 599-605.
- Branciarini, R., Galarini, R., Giusepponi, D., Trabalza-Marinucci, M., Forte, C., Roila, R., ... Valiani, A. (2017). Oxidative status and presence of bioactive compounds in meat from chickens fed polyphenols extracted from olive oil industry waste. *Sustainability*, *9*(9), 1566.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.-E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, *28*(1), 25-30.
- Brudy Technology. (s. f.). Recuperado 30 de septiembre de 2019, de <http://www.brudy.net/>
- Bubonja-Sonje, M., Giacometti, J., & Abram, M. (2011). Antioxidant and antilisterial activity of olive oil, cocoa and rosemary extract polyphenols. *Food Chemistry*, *127*(4), 1821-1827.
- Buckland, G., & Gonzalez, C. A. (2015). The role of olive oil in disease prevention: A focus on the recent epidemiological evidence from cohort studies and dietary intervention trials. *The British Journal of Nutrition*, *113*(Suppl 2), S94-101.
- Buettner, G. R. (1993). The pecking order of free radicals and antioxidants: Lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *300*(2), 535-543.
- Bulotta, S., Celano, M., Lepore, S. M., Montalcini, T., Pujia, A., & Russo, D. (2014). Beneficial effects of the olive oil phenolic components oleuropein and hydroxytyrosol: Focus on protection against cardiovascular and metabolic diseases. *Journal of Translational Medicine*, *12*, 219.

- Byun, H.-G., Taekil, E., Jung, W.-K., & Kim, S.-J. (2008). Characterization of fish oil extracted from fish processing by-products. *Journal of Food Science and Nutrition*, *13*, 7-11.
- Cádiz-Gurrea, M., Borrás-Linares, I., Lozano-Sánchez, J., Joven, J., Fernández-Arroyo, S., & Segura-Carretero, A. (2017). Cocoa and grape seed byproducts as a source of antioxidant and anti-inflammatory proanthocyanidins. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(2), 376.
- Cardoso, C., Afonso, C., & Bandarra, N. M. (2016). Dietary DHA and health: cognitive function ageing. *Nutrition Research Reviews*, *29*(2), 281-294.
- Castillo, J., Benavente-García, O., Del Baño, M. J., Lorente, J., Alcaraz, M., & Dato, M. J. (2001). Radioprotective effects against chromosomal damage induced in human lymphocytes by  $\gamma$ -rays as a function of polymerization grade of grape seed extracts. *Journal of medicinal food*, *4*(2), 117-123.
- Castillo, J., Benavente-García, O., Lorente, J., Alcaraz, M., Redondo, A., Ortuño, A., & Del Rio, J. A. (2000a). Antioxidant activity and radioprotective effects against chromosomal damage induced in vivo by X-rays of flavan-3-ols (Procyanidins) from grape seeds (*Vitis vinifera*): comparative study versus other phenolic and organic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*(5), 1738-1745.
- Charoenprasert, S., & Mitchell, A. (2012). Factors influencing phenolic compounds in table olives (*Olea europaea*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*(29), 7081-7095.
- Chaves-López, C., Serio, A., Mazzarrino, G., Martuscelli, M., Scarpone, E., & Paparella, A. (2015). Control of household mycoflora in fermented sausages using phenolic fractions from olive mill wastewaters. *International Journal of Food Microbiology*, *207*, 49-56.
- Chen, X., Zhang, Y., Zu, Y., Yang, L., Lu, Q., & Wang, W. (2014). Antioxidant effects of rosemary extracts on sunflower oil compared with synthetic antioxidants. *International Journal of Food Science & Technology*, *49*(2), 385-391.

- Christian, M. S., Sharper, V. A., Hoberman, A. M., Seng, J. E., Fu, L., Covell, D., ... Crea, R. (2004). The toxicity profile of hydrolyzed aqueous olive pulp extract. *Drug and Chemical Toxicology*, 27(4), 309-330.
- Covas, M.-I., de la Torre, R., & Fitó, M. (2015). Virgin olive oil: A key food for cardiovascular risk protection. *The British Journal of Nutrition*, 113(Suppl 2), S19-28.
- D'Angelo, S., Ingrosso, D., Migliardi, V., Sorrentino, A., Donnarumma, G., Baroni, A., ... Galletti, P. (2005). Hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil, prevents protein damage induced by long-wave ultraviolet radiation in melanoma cells. *Free Radical Biology & Medicine*, 38(7), 908-919.
- Dawidowicz, A. L., Wianowska, D., & Olszowy, M. (2012). On practical problems in estimation of antioxidant activity of compounds by DPPH method (Problems in estimation of antioxidant activity). *Food Chemistry*, 131(3), 1037-1043.
- de Camargo, A. C., Regitano-d'Arce, M. A. B., de Alencar, S. M., Canniatti-Brazaca, S. G., de Souza Vieira, T. M. F., & Shahidi, F. (2016). Chemical Changes and Oxidative Stability of Peanuts as Affected by the Dry-Blanching. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 93(8), 1101-1109.
- Del Baño, M. J., Benavente-Garcia, O., Marín, P., Marín, A., & Castillo, J. (2006). The carnosic acid oxidation pathway. Its influence on food processes. *Nutrafoods*, 5(2), 41-48.
- del Baño, M. J., Lorente, J., Castillo, J., Benavente-García, O., del Río, J. A., Ortuño, A., ... Gerard, D. (2003). Phenolic diterpenes, flavones, and rosmarinic acid distribution during the development of leaves, flowers, stems, and roots of *Rosmarinus officinalis*. Antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(15), 4247-4253.
- Diario Oficial de la Unión Europea. (2012). Reglamento (UE) No 231/2012 de la Comisión de 9 de marzo de 2012 por el que se establecen especificaciones para los aditivos alimentarios que figuran en los anexos II y III del Reglamento (CE) no 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo. *Official Journal of the European Union*.

- Dilas, S., Knez, Ž., Četojević-Simin, D., Tumbas, V., Škerget, M., Čanadanović-Brunet, J., & Ćetković, G. (2012). *In vitro* antioxidant and antiproliferative activity of three rosemary (*Rosmarinus officinalis L.*) extract formulations. *International Journal of Food Science & Technology*, 47(10), 2052-2062.
- Directiva 95/2/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 20 de febrero de 1995 relativa a aditivos alimentarios distintos de los colorantes y edulcorantes. (1995, marzo 18). *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*, 16.
- Directiva 2008/84/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 27 de agosto de 2008 por la que se establecen criterios específicos de pureza de los aditivos alimentarios distintos de los colorantes y edulcorantes. (2008, agosto 27). *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*, 253(1), 175.
- Dobarganes, M. C., & Velasco, J. (2002). Analysis of lipid hydroperoxides. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104(7), 420-428.
- Dolatabadi, J. E. N., & Kashanian, S. (2010). A review on DNA interaction with synthetic phenolic food additives. *Food Research International*, 43(5), 1223-1230.
- dos Santos Raymundo, M., Marques da Silva Paula, M., Franco, C., & Fett, R. (2007). Quantitative determination of the phenolic antioxidants using voltammetric techniques. *LWT - Food Science and Technology*, 40(7), 1133-1139.
- Duba, K. S., & Fiori, L. (2015). Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of grape seed oil: Effect of process parameters on the extraction kinetics. *The Journal of Supercritical Fluids*, 98, 33-43.
- EFSA. (2015a). Scientific Opinion on the re-evaluation of ascorbyl palmitate (E 304(i)) and ascorbyl stearate (E 304(ii)) as food additives. *EFSA Journal*, 13(11), 4289.
- EFSA. (2015b). Scientific Opinion on the re-evaluation of tocopherol-rich extract (E 306),  $\alpha$ -tocopherol (E 307),  $\gamma$ -tocopherol (E 308) and  $\delta$ -tocopherol (E 309) as food additives. *EFSA Journal*, 13(9), 4247.

- EFSA ANS Panel. (2008). Use of rosemary extracts as a food additive-Scientific opinion of the panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food. *EFSA Journal*, 721, 1–29.
- EFSA ANS Panel. (2016). Statement on the refined exposure assessment of tertiary-butyl hydroquinone (E 319)1. *EFSA Journal*, 14(1), 2588.
- EFSA ANS Panel. (2018). Refined exposure assessment of extracts of rosemary (E 392) from its use as food additive. *EFSA Journal*, 16(8).
- EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). (2011). Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to polyphenols in olive and protection of LDL particles from oxidative damage (ID 1333, 1638, 1639, 1696, 2865), maintenance of normal blood HDL cholesterol concentrations (ID 1639), maintenance of normal blood pressure (ID 3781), “anti-inflammatory properties” (ID 1882), “contributes to the upper respiratory tract health” (ID 3468), “can help to maintain a normal function of gastrointestinal tract” (3779), and “contributes to body defences against external agents” (ID 3467) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal*, 9(4), 2033.
- Emerton, V., & Choi, E. (2008). 1. Food Additives and why they are Used. En *Essential Guide to Food Additives* (pp. 1-21). United Kingdom: Leatherhead Food International.
- Escribano-Bailon, Teresa., Gutierrez-Fernandez, Yolanda., Rivas-Gonzalo, J. C., & Santos-Buelga, Celestino. (1992). Characterization of procyanidins of *Vitis vinifera* variety Tinta del Pais grape seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(10), 1794-1799.
- Fadda, A., Serra, M., Molinu, M. G., Azara, E., Barberis, A., & Sanna, D. (2014). Reaction time and DPPH concentration influence antioxidant activity and kinetic parameters of bioactive molecules and plant extracts in the reaction with the DPPH radical. *Journal of Food Composition and Analysis*, 35(2), 112-119.
- FAO (Ed.). (2018). The state of world fisheries and aquaculture 2018. *Meeting the sustainable development goals*. Rome: FAO.

- FDA. (2018, febrero 28). GRAS Notices. GRN No. 726. Recuperado 6 noviembre de 2019.  
<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/fdcc/index.cfm?set=GRASNotices&id=726>
- Flaiz, L., Freire, M., Cofrades, S., Mateos, R., Weiss, J., Jiménez-Colmenero, F., & Bou, R. (2016). Comparison of simple, double and gelled double emulsions as hydroxytyrosol and n-3 fatty acid delivery systems. *Food Chemistry*, *213*, 49-57.
- Frankel, Edwin N. (1996). Antioxidants in lipid foods and their impact on food quality. *Food Chemistry*, *57*(1), 51-55.
- Frankel, Edwin N. (2005a). Biological systems. En *The Oil Press Lipid Library: Vol. 18. Lipid Oxidation—2nd Edition* (pp. 391-446). Cambridge, UK: Woodhead Publishing Limited.
- Frankel, Edwin N. (2005c). Introduction. En *The Oil Press Lipid Library: Vol. 18. Lipid Oxidation—2nd Edition* (pp. 1-14). Cambridge, UK: Woodhead Publishing Limited.
- Frankel, Edwin N. (2005). *Lipid oxidation (2nd edition)*. Cambridge, UK: Woodhead Publishing Limited.
- Fukumoto, L. R., & Mazza, G. (2000). Assessing Antioxidant and Prooxidant Activities of Phenolic Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*(8), 3597-3604.
- Fuller, G., Guadagni, D. G., Weaver, M. L., Notter, G., & Horvat, R. J. (1971). Evaluation of Oleic Safflower Oil in Frying of Potato Chips. *Journal of Food Science*, *36*(1), 43-44. h
- Furukawa, S., Usuda, K., Tamura, T., Kubota, R., Ikeyama, S., Goryo, M., ... Okada, K. (2001). Effect of Butylated Hydroxytoluene on Cell Population in Rat Hepatocytes. *Journal of Toxicologic Pathology*, *14*(2), 145-145.
- Garavaglia, J., Markoski, M. M., Oliveira, A., & Marcadenti, A. (2016). Grape Seed Oil Compounds: Biological and Chemical Actions for Health. *Nutrition and Metabolic Insights*, *9*, 59-64.

- Girard, B., & Mazza, G. (1998). Functional grape and citrus products. En *Functional Foods: Biochemical and Processing Aspects* (Vol. 1, pp. 139-191). Lancaster, PA, USA: CRC Press.
- Gómez-Soler, M., Cordobilla, B., Morató, X., Fernández-Dueñas, V., Domingo, J. C., & Ciruela, F. (2018). Triglyceride Form of Docosahexaenoic Acid Mediates Neuroprotection in Experimental Parkinsonism. *Frontiers in Neuroscience*, *12*(604), 1-11.
- Gordon, M. L. H., & Mursi, E. (1994). A comparison of oil stability based on the metrohm rancimat with storage at 20°C. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *71*, 649-651.
- Gordon, M.H. (1990). The mechanism of antioxidant action in vitro. En *Elsevier Applied Food Science Series. Food Antioxidants* (pp. 1-18). Netherlands: Springer.
- Gordon, Michael H, & Kourkimská, L. (1995). The effects of antioxidants on changes in oils during heating and deep frying. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *68*(3), 347-353.
- Granados-Principal, S., El-Azem, N., Pamplona, R., Ramirez-Tortosa, C., Pulido-Moran, M., Vera-Ramirez, L., ... Ramirez-Tortosa, M. (2014). Hydroxytyrosol ameliorates oxidative stress and mitochondrial dysfunction in doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats with breast cancer. *Biochemical Pharmacology*, *90*(1), 25-33.
- Grompone, M. A. (1991). Anisidine value as a measurement of the latent damage of fats. *Grasas y Aceites*, *42*(1), 8-13.
- Guo, Q., Gao, S., Sun, Y., Gao, Y., Wang, X., & Zhang, Z. (2016). Antioxidant efficacy of rosemary ethanol extract in palm oil during frying and accelerated storage. *Industrial Crops and Products*, *94*, 82-88.
- Hasenhuettl, G. L., & Wan, P. J. (1992). Temperature effects on the determination of oxidative stability with the metrohm rancimat. *Journal of the American Oil Chemists Society*, *69*(6), 525-527.
- Heilman, J., Anyangwe, N., Tran, N., Edwards, J., Beilstein, P., & López, J. (2015). Toxicological evaluation of an olive extract, H35: Subchronic toxicity in the rat. *Food and Chemical Toxicology*, *84*, 18-28.

- Hijazi, A. K., Taha, Z. A., Ajlouni, A. M., Al-Momani, W. M., Idris, I. M., & Hamra, E. A. (2017). Synthesis and Biological Activities of Lanthanide (III) Nitrate Complexes with N-(2-hydroxynaphthalen-1-yl) methylene Nicotinohydrazide Schiff Base. *Medicinal Chemistry*, 13(1), 77-84.
- Huang, S.-W., Frankel, E. N., & German, J. B. (1994). Antioxidant activity of alpha.- and .gamma.-tocopherols in bulk oils and in oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(10), 2108-2114.
- Hussain, H. H., Babic, G., Durst, T., Wright, J. S., Flueraru, M., Chichirau, A., & Chepelev, L. L. (2003). Development of novel antioxidants: Design, synthesis, and reactivity. *The Journal of Organic Chemistry*, 68(18), 7023-7032.
- Merrill, L., Pike, O., Ogden, L., & Dunn, M. (2008). Oxidative Stability of Conventional and High-Oleic Vegetable Oils with Added Antioxidants *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 85, 771-776.
- Ibarra, A., Cases, J., Bily, A., He, K., Bai, N., Roller, M., ... Ripoll, C. (2010). Importance of extract standardization and *in vitro/ex vivo* assay selection for the evaluation of antioxidant activity of botanicals: A case study on three *Rosmarinus officinalis* L. Extracts. *Journal of Medicinal Food*, 13(5), 1167-1175.
- Isbell, T. A., Abbott, T. P., & Carlson, K. D. (1999). Oxidative stability index of vegetable oils in binary mixtures with meadowfoam oil. *Industrial Crops and Products*, 9(2), 115-123.
- Iwig, M., Glaesser, D., Fass, U., & Struck, H. G. (2004). Fatty acid cytotoxicity to human lens epithelial cells. *Experimental Eye Research*, 79(5), 689-704.
- Jabbari, M., & Gharib, F. (2012). Solvent dependence on antioxidant activity of some water-insoluble flavonoids and their cerium (IV) complexes. *Journal of Molecular Liquids*, 168, 36-41.
- Jacobsen, C. (2010). Challenges when developing omega-3 enriched foods. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides*, 17(4), 251-258.
- Jayaprakasha, G. K., Selvi, T., & Sakariah, K. K. (2003). Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. *Food research international*, 36(2), 117-122.

- Jayaprakasha, G. K., Singh, R. P., & Sakariah, K. K. (2001). Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro. *Food Chemistry*, *73*(3), 285-290.
- Jordán, Lax, V., Rota, M. C., Lorán, S., & Sotomayor, J. A. (2012). Relevance of carnosic acid, carnosol, and rosmarinic acid concentrations in the in vitro antioxidant and antimicrobial activities of *Rosmarinus officinalis* (L.) methanolic extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*(38), 9603-9608.
- Jordán, M. J., Castillo, J., Bañón, S., Martínez-Conesa, C., & Sotomayor, J. A. (2014). Relevance of the carnosic acid/carnosol ratio for the level of rosemary diterpene transfer and for improving lamb meat antioxidant status. *Food Chemistry*, *151*, 212-218.
- Joshi, S. S., Kuszynski, C. A., & Bagchi, D. (2001). The cellular and molecular basis of health benefits of grape seed proanthocyanidin extract. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, *2*(2), 187-200.
- Kappus, H., & Diplock, A. T. (1992). Tolerance and safety of vitamin E: A toxicological position report. *Free Radical Biology and Medicine*, *13*(1), 55-74.
- Kaur, M., Singh, R. P., Gu, M., Agarwal, R., & Agarwal, C. (2006). Grape seed extract inhibits in vitro and in vivo growth of human colorectal carcinoma cells. *Clinical Cancer Research*, *12*(20 Pt 1), 6194-6202.
- Kedare, S. B., & Singh, R. P. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of food science and technology*, *48*(4), 412-422.
- Keller, J., Camaré, C., Bernis, C., Astello-García, M., de la Rosa, A.-P. B., Rossignol, M., ... Guéraud, F. (2015). Antiatherogenic and antitumoral properties of *Opuntia cladodes*: Inhibition of low density lipoprotein oxidation by vascular cells, and protection against the cytotoxicity of lipid oxidation product 4-hydroxynonenal in a colorectal cancer cellular model. *Journal of Physiology and Biochemistry*, *71*(3), 577-587.
- Kerrihard, A. L., Pegg, R. B., Sarkar, A., & Craft, B. D. (2015). Update on the methods for monitoring UFA oxidation in food products. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *117*(1), 1-14.

- Khanal, R. C., Howard, L. R., & Prior, R. L. (2010). Effect of heating on the stability of grape and blueberry pomace procyanidins and total anthocyanins. *Food Research International*, *43*(5), 1464-1469.
- Kim, S.-Y., Jeong, S.-M., Park, W.-P., Nam, K. C., Ahn, D. U., & Lee, S.-C. (2006). Effect of heating conditions of grape seeds on the antioxidant activity of grape seed extracts. *Food Chemistry*, *97*(3), 472-479.
- Kinsella, J. E. (1974). Grapeseed oil: A rich source of linoleic acid. *Food Technology*, *28*, 58-60.
- Kiokias, S., Varzakas, T., & Oreopoulou, V. (2008). *In vitro* activity of vitamins, flavonoids, and natural phenolic antioxidants against the oxidative deterioration of oil-based systems. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *48*(1), 78-93.
- Klančnik, A., Guzej, B., Kolar, M. H., Abramovič, H., & Možina, S. S. (2009). *In vitro* antimicrobial and antioxidant activity of commercial rosemary extract formulations. *Journal of Food Protection*, *72*(8), 1744-1752.
- Krauss, R. M., Eckel, R. H., Howard, B., Appel, L. J., Daniels, S. R., Deckelbaum, R. J., ... Bazzarre, T. L. (2000). AHA Dietary Guidelines: Revision 2000: A statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee of the American Heart Association. *Circulation*, *102*(18), 2284-2299.
- Krawczyńska, A., Olczak, E., Rembiszewska, A., & Gromadzka-Ostrowska, J. (2013). High-fat, cholesterol-rich diet affects leptin expression in the aortic layers. *Experimental Biology and Medicine*, *238*(1), 47-56.
- Kris-Etherton Penny M., Harris William S., & Appel Lawrence J. (2002). Fish Consumption, Fish Oil, Omega-3 Fatty Acids, and Cardiovascular Disease. *Circulation*, *106*(21), 2747-2757.
- Lachman, J., Hejtmánková, A., Táborský, J., Kotíková, Z., Pivec, V., Štralková, R., ... Dědina, M. (2015). Evaluation of oil content and fatty acid composition in the seed of grapevine varieties. *LWT - Food Science and Technology*, *63*(1), 620-625.
- Lau, D. W., & King, A. J. (2003). Pre- and post-mortem use of grape seed extract in dark poultry meat to inhibit development of thiobarbituric acid reactive substances. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*(6), 1602-1607.

- Lee, Y. Y., Crauste, C., Wang, H., Leung, H. H., Vercauteren, J., Galano, J.-M., ... Lee, J. C.-Y. (2016). Extra Virgin Olive Oil reduced polyunsaturated fatty acid and cholesterol oxidation in rodent liver: Is this accounted for hydroxytyrosol-fatty acid conjugation? *Chemical Research in Toxicology*, *29*(10), 1689-1698.
- Li, J., Solval, K. M., Alfaro, L., Zhang, J., Chotiko, A., Delgado, J. L. B., ... Sathivel, S. (2015). Effect of Blueberry Extract From Blueberry Pomace on the microencapsulated fish oil. *Journal of Food Processing and Preservation*, *39*(2), 199-206.
- Liebler, D. C. (1993). The role of metabolism in the antioxidant function of vitamin E. *Critical Reviews in Toxicology*, *23*(2), 147-169.
- Liu, H.-R., & White, P. J. (1992). Oxidative stability of soybean oils with altered fatty acid compositions. *Journal of the American Oil Chemists Society*, *69*(6), 528-532.
- López de Las Hazas, M.-C., Piñol, C., Macià, A., & Motilva, M.-J. (2017). Hydroxytyrosol and the colonic metabolites derived from virgin olive oil intake induce cell cycle arrest and apoptosis in colon cancer cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *65*(31), 6467-6476.
- Lutterodt, H., Slavin, M., Whent, M., Turner, E., & Yu, L. L. (2011). Fatty acid composition, oxidative stability, antioxidant and antiproliferative properties of selected cold-pressed grape seed oils and flours. *Food Chemistry*, *128*(2), 391-399.
- Ma, Z. F., & Zhang, H. (2017). Phytochemical Constituents, Health Benefits, and Industrial applications of grape seeds: A Mini-Review. *Antioxidants*, *6*(3), 71. <https://doi.org/10.3390/antiox6030071>
- Maffei Facino, R., Carini, M., Aldini, G., Bombardelli, E., Morazzoni, P., & Morelli, R. (1994). Free radicals scavenging action and anti-enzyme activities of procyanidines from *Vitis vinifera*. A mechanism for their capillary protective action. *Arzneimittelforschung*, *44*(5), 592-601.
- Majchrzak, T., Wojnowski, W., Dymerski, T., Gębicki, J., & Namieśnik, J. (2018). Electronic noses in classification and quality control of edible oils: A review. *Food Chemistry*, *246*, 192-201.

- Maki, K. C., & Dicklin, M. R. (2018). Omega-3 Fatty acid supplementation and cardiovascular disease risk: glass half full or time to nail the coffin shut? *Nutrients*, *10*(7), 864.
- Makris, D. P., Boskou, G., & Andrikopoulos, N. K. (2007). Polyphenolic content and in vitro antioxidant characteristics of wine industry and other agri-food solid waste extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, *20*(2), 125-132.
- Manual 743 Rancimat. (s. f.). Recuperado 14 de mayo de 2018, de <https://www.metrohm.com/es/documents/87438003>
- Maqsood, S., Benjakul, S., & Kamal-Eldin, A. (2012). Extraction, Processing, and Stabilization of Health-Promoting Fish Oils. *Recent patents on food, nutrition & agriculture*, *4*, 141-147.
- Marchioli, R., Schweiger, C., Tavazzi, L., & Valagussa, F. (2001). Efficacy of n-3 polyunsaturated fatty acids after myocardial infarction: Results of GISSI-Prevenzione trial. Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardico. *Lipids*, *36*, Suppl, S119-126.
- Markaryan, Sh. A., Tavadyan, L. A., Kocharyan, G. G., & Shahinyan, G. A. (2013). Effect of dimethyl sulfoxide on electrochemical and antiradical properties of ascorbic acid. *Russian Chemical Bulletin*, *62*(7), 1625-1629.
- Martin, D., Garcia-Serrano, A., Casado, V., Vázquez, L., Reglero, G., & Torres, C. F. (2014). Antioxidant activity of phosphatidyl derivatives of hydroxytyrosol in edible oils: Phosphatidyl hydroxytyrosol as antioxidant in oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *116*(8), 1035-1043.
- Martínez, J., Nieto, G., Castillo, J., & Ros, G. (2014). Influence of in vitro gastrointestinal digestion and/or grape seed extract addition on antioxidant capacity of meat emulsions. *LWT- Food Science and Technology*, *59*, 834-840.
- Martínez, M. L., Penci, Ma. C., Ixtaina, V., Ribotta, P. D., & Maestri, D. (2013). Effect of natural and synthetic antioxidants on the oxidative stability of walnut oil under different storage conditions. *LWT - Food Science and Technology*, *51*(1), 44-50.

- Martínez-Tomé, M., Jiménez, A. M., Ruggieri, S., Frega, N., Strabbioli, R., & Murcia, M. A. (2001). Antioxidant Properties of mediterranean spices compared with common food additives. *Journal of Food Protection*, *64*(9), 1412-1419.
- Matthäus, B. (2010). Oxidation of edible oils. En *Oxidation in Foods and Beverages and Antioxidant Applications: Management in different industry sectors* (1st Edition, Vol. 2, pp. 183-238). Cambridge, UK: Woodhead Publishing Limited.
- Matthäus, Bertrand. (2008). Virgin grape seed oil: Is it really a nutritional highlight? *European Journal of Lipid Science and Technology*, *110*(7), 645-650.
- McClements, J., & Decker, E. A. (2010). Lípidos. En *Fennema química de los alimentos* (3a. Edición, pp. 155-214). Zaragoza, España: Acibia, S.A.
- Medina, E., de Castro, A., Romero, C., & Brenes, M. (2006). Comparison of the concentrations of phenolic compounds in olive oils and other plant oils: Correlation with antimicrobial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(14), 4954-4961.
- Merola, N., Castillo, J., Benavente-García, O., Ros, G., & Nieto, G. (2017). The effect of consumption of citrus fruit and olive leaf extract on lipid metabolism. *Nutrients*, *9*(10), 1062.
- Merrill, L. I., Pike, O. A., Ogden, L. V., & Dunn, M. L. (2008). Oxidative Stability of Conventional and High-Oleic Vegetable Oils with Added Antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *85*(8), 771-776.
- Min, D. B., & Boff, J. M. (2002). Lipid Oxidation of Edible Oil. En *Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology, Second Edition* (2nd ed., pp. 335-363). Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Minotti, G. (1993). Sources and role of iron in lipid peroxidation. *Chemical Research in Toxicology*, *6*(2), 134-146.
- Mishra, K., Ojha, H., & Chaudhury, N. K. (2012). Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food Chemistry*, *130*(4), 1036-1043.

- Muñoz, I., Díaz, M. T., Apeleo, E., Pérez-Santaescolástica, C., Rivas-Cañedo, A., Pérez, C., ... Fuente, J. de la. (2017). Valorisation of an extract from olive oil waste as a natural antioxidant for reducing meat waste resulting from oxidative processes. *Journal of Cleaner Production*, 140, 924-932.
- Mukhopadhyay, A. K. (2006). *Antioxidants-Natural and Synthetic*. Germany: Amani International Publishers Kiel.
- Munne-Bosch, S., Schwarz, K., & Alegre, L. (1999). Enhanced formation of  $\alpha$ -tocopherol and highly oxidized abietane diterpenes in water-stressed rosemary plants. *Plant Physiology*, 121, 1047-1052.
- Nagai, F., Okubo, T., Ushiyama, K., Satoh, K., & Kano, I. (1996). Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine in calf thymus DNA treated with tert-butylhydroquinone, a major metabolite of butylated hydroxyanisole. *Toxicology Letters*, 89(2), 163-167.
- Nakamura, Y., Tsuji, S., & Tonogai, Y. (2003). Analysis of Proanthocyanidins in Grape Seed Extracts, Health Foods and Grape Seed Oils. *Journal of Health Science*, 49(1), 45-54.
- Navas, P. (2009). Chemical composition of the virgin oil obtained by mechanical pressing from several grape seed varieties (*Vitis vinifera* L.) with emphasis on minor constituents. *Archivos latinoamericanos de nutrición*, 59, 214-219.
- Nieto, G., Martínez, L., Castillo, J., & Ros, G. (2017). Hydroxytyrosol extracts, olive oil and walnuts as functional components in chicken sausages. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 97(11):3761-3771.
- Nieto, G., Martínez, L., Castillo, J., & Ros, G. (2017). Effect of hydroxytyrosol, walnut and olive oil on nutritional profile of Low-Fat Chicken Frankfurters: Functional frankfurters with hydroxytyrosol and walnut. *European Journal of Lipid Science and Technology* 119(9), 1600518 (1-14).
- Nieto, G., Ros, G. & Castillo, J. (2018). Antioxidant and Antimicrobial Properties of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*, L.): A Review. *Medicines*, 5(98), 1-13.

- Normand, L., Eskin, M., & Przybylski, R. (2006). Comparison of the stability of regular and high-oleic sunflower oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *83*, 331-334.
- Okubo, T, Yokoyama, Y., Kano, K., & Kano, I. (2003). Cell death induced by the phenolic antioxidant tert-butylhydroquinone and its metabolite tert-butylquinone in human monocytic leukemia U937 cells. *Food and Chemical Toxicology*, *41*(5), 679-688.
- Okubo, Tomoko, Nagai, F., Ushiyama, K., & Kano, I. (1997). Contribution of oxygen radicals to DNA cleavage by quinone compounds derived from phenolic antioxidants, tert-butylhydroquinone and 2,5-di-tert-butylhydroquinone. *Toxicology Letters*, *90*(1), 11-18.
- Oliveras-López, M.-J., Berná, G., Jurado-Ruiz, E., López-García de la Serrana, H., & Martín, F. (2014). Consumption of extra-virgin olive oil rich in phenolic compounds has beneficial antioxidant effects in healthy human adults. *Journal of Functional Foods*, *10*, 475-484.
- Olpin, S. E. (2005). Fatty acid oxidation defects as a cause of neuromyopathic disease in infants and adults. *Clinical Laboratory*, *51*(5-6), 289-306.
- Pardo, J. E., Fernández, E., Rubio, M., Alvarruiz, A., & Alonso, G. L. (2009). Characterization of grape seed oil from different grape varieties (*Vitis vinifera*). *European Journal of Lipid Science and Technology*, *111*(2), 188-193.
- Park, S. Y., Lee, Y.-H., Choi, K.-C., Seong, A.-R., Choi, H.-K., Lee, O.-H., ... Yoon, H.-G. (2011). Grape seed extract regulates androgen receptor-mediated transcription in prostate cancer cells through potent anti-histone acetyltransferase activity. *Journal of Medicinal Food*, *14*(1-2), 9-16.
- Paschke, R. F., & Wheeler, D. H. (1944). Formation and decomposition of peroxides of unsaturated fat esters. *Oil & Soap*, *21*(2), 52-57.
- Pérez, J. A. M., & FregosoAguilar, T. A. (2013). Chemistry of natural antioxidants and studies performed with different plants collected in Mexico. Oxidative stress and chronic degenerative diseases - A Role for Antioxidants. <https://doi.org/10.5772/52247>

- Pérez-Bonilla, M., Salido, S., van Beek, T. A., & Altarejos, J. (2014). Radical-Scavenging Compounds from olive tree (*Olea europaea* L.) Wood. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *62*(1), 144-151.
- Perumalla, A. V. S., & Hettiarachchy, Navam. S. (2011). Green tea and grape seed extracts—Potential applications in food safety and quality. *Food Research International*, *44*(4), 827-839.
- Pop, A., Drugan, T., Gutleb, A. C., Lupu, D., Cherfan, J., Loghin, F., & Kiss, B. (2016). Individual and combined in vitro (anti)androgenic effects of certain food additives and cosmetic preservatives. *Toxicology in Vitro*, *32*, 269-277.
- Poudel, P. R., Tamura, H., Kataoka, I., & Mochioka, R. (2008). Phenolic compounds and antioxidant activities of skins and seeds of five wild grapes and two hybrids native to Japan. *Journal of Food Composition and Analysis*, *21*(8), 622-625.
- Powell, C. J., Connelly, J. C., Jones, S. M., Grasso, P., & Bridges, J. W. (1986). Hepatic responses to the administration of high doses of BHT to the rat: Their relevance to hepatocarcinogenicity. *Food and Chemical Toxicology*, *24*(10-11), 1131-1143.
- Prieur, C., Rigaud, J., Cheynier, V., & Moutounet, M. (1994). Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds. *Phytochemistry*, *36*(3), 781-784.
- Quek, S.-Y., Chen, B.-S., & Baharin, B. (2007). Commercial extraction of vitamin E from food sources. En *The Encyclopedia of Vitamin E*. (pp. 140-152). Wallingford, UK: Preedy VR and Watson RR. CABI.
- Rajeev, P. S., Johannah, N. M., Gopakumar, G., Maliakel, B., & Krishnakumar, I. M. (2017). Optimization of antioxidant efficacy of a deflavored and decolorized rosemary extract: Effect of carnosol content on the oxidative stability of paprika colored beef patties. *Journal of Food Science and Technology*, *54*(6), 1665-1677.
- Rašković, A., Milanović, I., Pavlović, N., Čebović, T., Vukmirović, S., & Mikov, M. (2014). Antioxidant activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oil and its hepatoprotective potential. *BMC complementary and alternative medicine*, *14*(1), 225.

- Reda, S. Y. (2011). Evaluation of antioxidants stability by thermal analysis and its protective effect in heated edible vegetable oil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 31(2), 475-480.
- Redondo-Cuevas, L., Castellano, G., & Raikos, V. (2017). Natural antioxidants from herbs and spices improve the oxidative stability and frying performance of vegetable oils. *International Journal of Food Science and Technology*, 52(11), 2422-2428.
- Reglamento (CE) No 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo de 16 de diciembre de 2008 sobre aditivos alimentarios. (2008, diciembre 31). Diario Oficial de la Unión Europea, 16.
- Reische, D. W., Lillard, D. A., & Eitenmiller, R. R. (2002). Antioxidants. *En Food Science and Technology: Vol. 117. Food lipids: Chemistry, nutrition, and biochemistry (2nd ed., rev.expanded)*. New York: M. Dekker.
- Ricardo da Silva, Jorge M., Rigaud, J., Cheynier, V., Cheminat, A., & Moutounet, M. (1991). Procyanidin dimers and trimers from grape seeds. *Phytochemistry*, 30(4), 1259-1264.
- Ricardo da Silva, Jorge Manuel, Rosec, J.-P., Bourzeix, M., & Heredia, N. (1990). Separation and quantitative determination of grape and wine procyanidins by high performance reversed phase liquid chromatography. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 53(1), 85-92.
- Rodríguez-Morató, J., Xicota, L., Fitó, M., Farré, M., Dierssen, M., & de la Torre, R. (2015). Potential role of olive oil phenolic compounds in the prevention of neurodegenerative diseases. *Molecules*, 20(3), 4655-4680.
- Romano, C. S., Abadi, K., Repetto, V., Vojnov, A. A., & Moreno, S. (2009). Synergistic antioxidant and antibacterial activity of rosemary plus butylated derivatives. *Food Chemistry*, 115(2), 456-461.
- Romeo Villadóniga, S., Rodríguez García, E., Sagastagoia Epelde, O., Álvarez Díaz, M. D., & Domingo Pedrol, J. C. (2018). Effects of Oral Supplementation with Docosahexaenoic Acid (DHA) plus Antioxidants in Pseudoexfoliative Glaucoma: A 6-Month Open-Label Randomized Trial. *Journal of Ophthalmology*, 2018:8259371.

- Sagdic, O., Ozturk, I., Ozkan, G., Yetim, H., Ekici, L., & Yilmaz, M. T. (2011). RP-HPLC–DAD analysis of phenolic compounds in pomace extracts from five grape cultivars: Evaluation of their antioxidant, antiradical and antifungal activities in orange and apple juices. *Food Chemistry*, *126*(4), 1749-1758.
- Saito, M., Hosoyama, H., Ariga, T., Kataoka, S., & Yamaji, N. (1998). Antiulcer Activity of Grape Seed Extract and Procyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *46*(4), 1460-1464.
- Sano, A., Uchida, R., Saito, M., Shioya, N., Komori, Y., Tho, Y., & Hashizume, N. (2007). Beneficial effects of grape seed extract on malondialdehyde-modified LDL. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, *53*(2), 174-182.
- Santos, N. A., Cordeiro, A. M. T. M., Damasceno, S. S., Aguiar, R. T., Rosenhaim, R., Carvalho Filho, J. R., ... Souza, A. G. (2012). Commercial antioxidants and thermal stability evaluations. *Fuel*, *97*, 638-643.
- Santos-Buelga, C., Francia-Aricha, E. M., & Escribano-Bailón, M. T. (1995). Comparative flavan-3-ol composition of seeds from different grape varieties. *Food Chemistry*, *53*(2), 197-201.
- Sayyad, R., Jafari, S., & Ghomi, M. (2017). Thermo-oxidative stability of soybean oil by natural extracted antioxidants from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *International Journal of Food Properties*, *20*(2), 436-446.
- Schaffer, S., Müller, W. E., & Eckert, G. P. (2010). Cytoprotective effects of olive mill wastewater extract and its main constituent hydroxytyrosol in PC12 cells. *Pharmacological Research*, *62*(4), 322-327.
- Schwarz, K., & Ternes, W. (1992). Antioxidative constituents of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis*. I. Determination of phenolic diterpenes with antioxidative activity amongst tocochromanols using HPLC. *Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und -Forschung*, *195*(2), 95-98.
- Shahidi, F. (2005). *Bailey's Industrial Oil and Fat Products, Volume 1, Edible Oil and Fat Products: Chemistry, Properties, and Health Effects*, 6th Edition. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
- Shahidi, F., Janitha, P. K., & Wanasundara, P. D. (1992). Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *32*(1), 67-103.

- Sharma, O. P., & Bhat, T. K. (2009). DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*, *113*(4), 1202-1205.
- Shinagawa, F. B., Santana, F. C. de, Torres, L. R. O., & Mancini-Filho, J. (2015). Grape seed oil: Apotential functional food? *Food Science and Technology*, *35*(3), 399-406.
- Shinagawa, F., Carvalho de Santana, F., & Filho, J. (2014). Effect of cold pressed grape seed oil on rats' biochemical markers and inflammatory profile. *Revista de Nutrição*, *28*, 65-76.
- Šimat, V., Vlahović, J., Soldo, B., Skroza, D., Ljubenkov, I., & Generalić Mekinić, I. (2019). Production and refinement of Omega-3 rich oils from processing by-products of farmed fish species. *Foods*, *8*(4), 125.
- Simopoulos, A. P. (1999). Essential fatty acids in health and chronic disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *70*(3 Suppl), 560S-569S.
- Soni, M. G., Burdock, G. A., Christian, M. S., Bitler, C. M., & Crea, R. (2006). Safety assessment of aqueous olive pulp extract as an antioxidant or antimicrobial agent in foods. *Food and Chemical Toxicology*, *44*(7), 903-915.
- Stojanović, M., Carević, M., Mihailović, M., Veličković, D., Dimitrijević, A., Milosavić, N., & Bezbradica, D. (2015). Influence of fatty acid on lipase-catalyzed synthesis of ascorbyl esters and their free radical scavenging capacity. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, *62*(4), 458-466.
- Strecker, L., Maza, A., & Winnie, G. (1990). Corn Oil-Composition, Processing and Utilization. En *Edible Fats and Oils Processing: Basic Principles and Modern Practices: World Conference Proceedings* (pp. 309-323). Champaign, IL, USA: The American Oil Chemists Society.
- Substances Added to Food (formerly EAFUS). (2019, abril 22). Recuperado 10 de agosto de 2019, de <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/fdcc/index.cfm?set=FoodSubstances&id=GRAPESEEXTRACT>

- Sun, Q., Prasad, R., Rosenthal, E., & Katiyar, S. K. (2011). Grape seed proanthocyanidins inhibit the invasive potential of head and neck cutaneous squamous cell carcinoma cells by targeting EGFR expression and epithelial-to-mesenchymal transition. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *11*, 134.
- Syed, A., Hu, M. & Jacobsen, C. (2016). Chapter 4-Oxidative Stability and Shelf Life of Vegetable Oils. En *Oxidative Stability and Shelf Life of Foods Containing Oils and Fats*. (pp. 187-207). USA: Academic Press and AOCS Press.
- Szabo, M. R., Radu, D., Gavrilas, S., Chambre, D., & Iditoiu, C. (2010). Antioxidant and Antimicrobial Properties of Selected Spice Extracts. *International Journal of Food Properties*, *13*(3), 535-545.
- Talbot, G. (2016). The stability and shelf life of fats and oils. En *The Stability and Shelf Life of Food* (Second edition, pp. 161-503). Cambridge, UK: Woodhead Publishing.
- Tellez-Vazquez, J. (2016). Omega-3 fatty acid supplementation improves dry eye symptoms in patients with glaucoma: Results of a prospective multicenter study. *Clinical Ophthalmology*, *10*, 617-626.
- Tena, N., Lobo-Prieto, A., Aparicio, R., & García-González, D. L. (2019). Storage and Preservation of Fats and Oils. En *Encyclopedia of Food Security and Sustainability* (pp. 605-618). Sevilla: Elsevier.
- Terpinc, P., Bezjak, M., & Abramovic, H. (2009). A kinetic model for evaluation of the antioxidant activity of several rosemary extracts. *Food Chemistry*, *115*(2), 740-744.
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., & Hawkins Byrne, D. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, *19*(6), 669-675.
- Thorsen, M. A., & Hildebrandt, K. S. (2003). Quantitative determination of phenolic diterpenes in rosemary extracts. Aspects of accurate quantification. *Journal of Chromatography. A*, *995*(1-2), 119-125.

- Tu, J.-L., & Yuan, J.-J. (2018). Thermal Decomposition Behavior of Hydroxytyrosol (HT) in Nitrogen Atmosphere Based on TG-FTIR Methods. *Molecules*, *23*(2), 404.
- Valenzuela B, R., Tapia O, G., González E, M., & Valenzuela B, A. (2011). Ácidos grasos omega-3 (EPA y DHA) y su aplicación en diversas situaciones clínicas. *Revista chilena de nutrición*, *38*(3), 356-367.
- Varzakas, T., Zakynthinos, G., & Verpoort, F. (2016). Plant Food Residues as a Source of Nutraceuticals and Functional Foods. *Foods*, *5*(4).
- Vennat, B., Bos, M. A., Pourrat, A., & Bastide, P. (1994). Procyanidins from tormentil: fractionation and study of the anti-radical activity towards superoxide anion. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, *17*(12), 1613-1615.
- Warner, K., Orr, P., & Glynn, M. (1997). Effect of fatty acid composition of oils on flavor and stability of fried foods. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *74*(4), 347-356.
- Wawire, M., Oey, I., Mathooko, F., Njoroge, C., Shitanda, D., & Hendrickx, M. (2011). Thermal stability of ascorbic acid and ascorbic acid oxidase in african cowpea leaves (*Vigna unguiculata*) of different maturities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*(5), 1774-1783.
- Weber, H. A., Hodges, A. E., Guthrie, J. R., O'Brien, B. M., Robaugh, D., Clark, A. P., ... Smith, C. S. (2007). Comparison of proanthocyanidins in commercial antioxidants: Grape Seed and Pine Bark Extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*(1), 148-156.
- Wei, Z., Luo, J., Huang, Y., Guo, W., Zhang, Y., Guan, H., ... Lu, J. (2017). Profile of Polyphenol Compounds of Five Muscadine Grapes Cultivated in the United States and in Newly Adapted Locations in China. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(3).
- Xie, J., & Schaich, K. M. (2014). Re-evaluation of the 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl Free Radical (DPPH) Assay for Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *62*(19), 4251-4260.
- Xie, Jia, VanAlstyne, P., Uhler, A., & Yang, X. (2017). A review on rosemary as a natural antioxidation solution. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *119*(6), 1600439.

- Yamakoshi, J., Saito, M., Kataoka, S., & Kikuchi, M. (2002). Safety evaluation of proanthocyanidin-rich extract from grape seeds. *Food and Chemical Toxicology*, *40*(5), 599-607.
- Yang, K.-M., & Chiang, P.-Y. (2017). Variation quality and kinetic parameter of commercial n-3 PUFA-rich oil during oxidation via Rancimat. *Marine Drugs*, *15*(4), 97.
- Yang, X., & Boyle, R. A. (2016). Chapter 3-Sensory Evaluation of Oils/Fats and Oil/Fat-Based Foods. En *Oxidative Stability and Shelf Life of Foods Containing Oils and Fats* (pp. 157-185). USA: Academic Press and AOCS Press.
- Yehye, W. A., Rahman, N. A., Ariffin, A., Abd Hamid, S. B., Alhadi, A. A., Kadir, F. A., & Yaeghoobi, M. (2015). Understanding the chemistry behind the antioxidant activities of butylated hydroxytoluene (BHT): A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *101*, 295-312.
- Yu, R., Tan, T.-H., & Kong, A.-N. T. (1997). Butylated hydroxyanisole and its metabolite tert-butylhydroquinone differentially regulate mitogen-activated protein kinases. The role of oxidative stress in the activation of mitogen-activated protein kinases by phenolic antioxidants. *Journal of Biological Chemistry*, *272*(46), 28962-28970.
- Zhang, S., Li, L., Cui, Y., Luo, L., Li, Y., Zhou, P., & Sun, B. (2017). Preparative high-speed counter-current chromatography separation of grape seed proanthocyanidins according to degree of polymerization. *Food Chemistry*, *219*, 399-407.
- Zhang, Y., Yang, L., Zu, Y., Chen, X., Wang, F., & Liu, F. (2010). Oxidative stability of sunflower oil supplemented with carnosic acid compared with synthetic antioxidants during accelerated storage. *Food Chemistry*, *118*(3), 656-662.
- Zoric, N., Horvat, I., Kopjar, N., Vucemilovic, A., Kremer, D., Tomic, S., & Kosalec, I. (2013). Hydroxytyrosol expresses antifungal activity in vitro. *Current Drug Targets*, *14*(9), 992-998.