

Estudio de la estabilidad de aceite comestible de girasol coloreado con pigmentos clorofílicos y con adición de oleorresina de orégano (*Origanum vulgare* L.) durante el almacenamiento en oscuridad

Por Erick Scheuermann^{1*}, Mara Cea¹, Siegrid Schoch², Mabel Ojeda¹ y Mónica Ihl¹

¹Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, Ciencias y Administración, Universidad de La Frontera. Casilla 54 D, Temuco, Chile. e-mail: ericks@ufro.cl

²Botanisches Institut der Universität München, D-80638 München, Menzingerstr. 67, Alemania.

RESUMEN

Estudio de la estabilidad de aceite comestible de girasol coloreado con pigmentos clorofílicos y con adición de oleorresina de orégano (*Origanum vulgare* L.) durante el almacenamiento en oscuridad.

Se estudió la estabilidad de aceite comestible de girasol (*Helianthus annuus* L.) de marca comercial sin antioxidantes, coloreado con pigmentos obtenidos de hojas verdes. Al aceite coloreado se adicionó oleorresina de orégano, como antioxidante, en cuatro concentraciones diferentes (200, 400, 600 y 800 ppm). Como controles, se utilizó aceite coloreado sin oleorresina (A.C.) y aceite puro (A.P.). Se almacenó en oscuridad y temperatura ambiente (10-20 °C) por seis meses. Se evaluó la oxidación de lípidos (ésteres metílicos de ácidos oleico y linoleico e índice de peróxidos), pigmentos clorofílicos y color.

El total de los pigmentos clorofílicos adicionados a las muestras de aceite comestible de girasol se mantuvo estable durante los tres primeros meses, evidenciándose sólo cambios en la proporción de clorofila *a,b* y feofitina *a,b* en el primer mes.

Dado que no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los tratamientos A.P. y A.C., para ésteres metílicos de ácidos oleico y linoleico e índice de peróxidos, se podría concluir que el aceite comestible de girasol coloreado muestra una estabilidad equivalente al aceite puro, cuando es almacenado en oscuridad por tres o seis meses. No se observó un claro efecto de la acción antioxidante que tendría la oleorresina de orégano adicionada al aceite coloreado.

PALABRAS-CLAVE: Aceite de girasol - Antioxidante natural - Colorantes - Oleorresina de orégano (*Origanum vulgare* L.) - Oxidación lipídica - Pigmentos clorofílicos.

SUMMARY

Stability study of edible sunflower oil colored with chlorophyll pigments and with addition of oregano oleoresin (*Origanum vulgare* L.) during the storage in darkness.

Sunflower (*Helianthus annuus* L.) oil was coloured with pigments extracted from green leaves. Different amounts (0, 200, 400, 600, and 800 ppm) of oleoresin extracted from oregano (*Origanum vulgare* L.) as antioxidant, were added to the coloured oil. As controls, coloured oil without oleoresin (A.C.) and pure oil (A.P.) were used. The samples were stored at room temperature (10-20 °C) in the dark for up to six months. During this time the oxidation of oleic acid, linoleic acid, peroxides index and the chlorophyll pigments were analyzed and the colour of the oil was determined. During the first month, only the ratio of chlorophyll to pheophytin changed, whereas all the other parameters stayed

constant, independently to the amount of antioxidant added. Since among the treatments A.C. and A.P. not significant differences ($p > 0,05$) were found, for oleic and linoleic methyl ester acids and peroxides index, it can be concluded that the edible, coloured sunflower oil shows an equivalent stability to the pure oil, when stored at darkness for three or six month. There was not observed an evident antioxidant action with the added oregano oleoresin to the coloured oil.

KEY-WORDS: Chlorophyll pigments - Colorants - Lipid oxidation - Natural antioxidant - Oregano oleoresin (*Origanum vulgare* L.) - Sunflower oil.

1. INTRODUCCIÓN

Variados esfuerzos han sido hechos para proporcionar estabilidad a los lípidos presentes en los alimentos. Para disminuir la rancidez de aceites y grasas, se ha usado antioxidantes sintéticos como *ter*-butil-4-hidroxianisol (BHA) y *ter*-butil-4-hidroxitolueno (BHT), y antioxidantes naturales como tocoferoles. Sin embargo, en varios países está restringido el uso de BHA y BHT, como aditivos en los alimentos, porque estos antioxidantes parecen causar un efecto indeseable en enzimas del hígado y pulmón humanos (Inatani *et al.*, 1983). Por esto se ha centrado la atención en plantas comestibles como fuentes de antioxidantes naturales seguros y más efectivos, entre ellas especias, como orégano, salvia, romero y tomillo, y también canela y cebolla. Se ha enfatizado la investigación en el efecto antioxidante y en la estructura química de los componentes activos (Chang *et al.*, 1977; Schmidt-Hebbel, 1980; Inatani *et al.*, 1983; Cuvelier *et al.*, 1994; Giese, 1994; Frankel *et al.*, 1996).

Lindberg and Bertelsen (1995) han reportado el efecto antioxidante de compuestos químicos presentes en el orégano (*Origanum vulgare* L.) e informan que cinco diferentes compuestos fenólicos con actividad antioxidante han sido aislados del extracto metanólico del orégano, siendo uno de ellos el ácido rosmarínico. Adballa and Roozen (1999) evidenciaron el efecto antioxidante de extracto de orégano aplicado en aceite de girasol a concentración de 600

y 1.200 ppm, bajo condiciones de oxidación acelerada (60 °C) y en oscuridad. En función de los compuestos con acción antioxidante, la aplicación de oleorresina de orégano puede ser una alternativa interesante para mantener estables los lípidos de aceites, grasas y otros alimentos en condiciones normales de almacenamiento.

El aceite de oliva virgen tiene un color natural que oscila del verde al amarillo dorado y se debe a la solubilización de pigmentos clorofílicos y carotenoides, que provienen de la aceituna (Gandul-Rojas *et al.*, 1999). Imitando lo que ocurre naturalmente, se ha pensado en colorear aceites vegetales no verdes. La incorporación de pigmentos clorofílicos naturales en alimentos lipídicos no está limitado desde el punto de vista toxicológico y su uso no representa peligro a la salud. La limitación en la adición de pigmentos clorofílicos como colorantes en aceites, grasas u otros alimentos se encuentra asociada a procesos de deterioro, dado que tales compuestos contribuyen a la formación de radicales libres, que promueven la autoxidación y fotoxidación de lípidos. La explicación biológica de la aparente inestabilidad de las clorofilas es que, en el estado excitado, estas metaloproteínas son agentes reductores fuertes y por lo tanto, fácilmente oxidadas. Las porfirinas de Mg pierden un electrón al ser excitadas por la luz como ocurre en la fotosíntesis (la razón biológica) o en el foto – blanqueo (el fenómeno que ocurre en la clorofila separada de su ambiente biológico natural). Después de la excitación, la clorofila oxidada resultante sufre una serie de reordenamientos electrónicos que llevan a la inestabilidad y los productos degeneran rápidamente en compuestos incoloros (Hendry, 1996). Henry (1996) señala que la adición de clorofila como colorante a productos alimenticios está bastante limitada, principalmente debido a la escasa estabilidad del pigmento. Sin embargo, Endo *et al.* (1985 a, b) reportaron que en pruebas aceleradas y en oscuridad, clorofilas y feofitinas presentaron actividad antioxidante al utilizar metil linoleato como sustrato y que las clorofilas a 30°C retardaron el deterioro de los triglicéridos del aceite comestible de semilla de colza y soja, al reducir los radicales libres.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la estabilidad de aceite comestible de girasol coloreado con pigmentos clorofílicos y evaluar el efecto antioxidante de oleorresina de orégano (*Origanum vulgare* L.) en el aceite almacenado en oscuridad durante seis meses.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Aceite, oleorresina y pigmentos clorofílicos

Se utilizó aceite comestible de girasol (*Helianthus annuus* L.) comercial, sin antioxidantes, pero que contenía como aditivos ácido cítrico y dimetilpolisilo-

xano. Todo el aceite empleado procedió de un mismo lote de fabricación.

Para extraer la oleorresina se mezcló 15 g de orégano (*Origanum vulgare* L.) con 150 mL metanol, se agitó a temperatura ambiente durante dos horas a 800 oscilaciones por minuto, procedimiento que se repitió 3 veces. El extracto obtenido fue secado en un rotavapor a vacío, a una temperatura de 85°C, quedando libre de solvente.

Como fuente de pigmentos se empleó hojas de diente de León (*Taraxacum officinalis*) y romaza (*Rumex crispus*) que se homogeneizó en un mortero con acetona al 80% y arena. Luego se centrifugó por 3 minutos a 1.041 x g. El sobrenadante fue traspasado a un embudo de decantación, se agitó suavemente con un doble volumen de dietiléter y se dejó reposar durante 2 minutos, obteniéndose la separación de fases; la fase inferior fue eliminada, se agregó 10 mL de agua destilada, se agitó nuevamente en forma suave para evitar la formación de una emulsión. Se dejó reposar y se eliminó la fase inferior. La fase etérea fue recibida en un vaso precipitado seco, se secó utilizando nitrógeno gaseoso, se adicionó gotas de acetona para evitar que queden restos de agua y se secó a temperatura ambiente. Los pigmentos fueron disueltos en un volumen conocido de acetona. De esta solución se preparó una dilución para ser leída en un espectrofotómetro Hewlett Packard 8452A y se cuantificó la cantidad de clorofila (clorofila a,b y feofitina a,b) extraída con las fórmulas indicadas en French (1969), Wellburn (1994) e Ihl *et al.* (1998) y además por HPLC.

2.2. Preparación de las muestras y descripción del experimento

En envases de plástico transparente de 500 mL se mezclaron los pigmentos disueltos en un mínimo de acetona, con el de aceite comestible de girasol, obteniendo una concentración medida por HPLC de 150 nmol de pigmentos clorofílicos por mL de aceite. La homogenización de los pigmentos en el aceite y la eliminación de la acetona se realizó con burbujeo de nitrógeno. Con esa concentración de pigmentos se obtuvo una coloración verde pálida, atrayente visualmente ($L^* 21,89$, $a^* 0,45$ y $b^* 4,13$).

Al aceite coloreado con pigmentos clorofílicos se adicionó oleorresina de orégano en cuatro concentraciones diferentes (200, 400, 600 y 800 ppm). Como controles, se utilizaron aceite coloreado sin oleorresina (A.C.) y aceite puro (A.P.). El experimento contó con cuatro repeticiones para cada uno de los seis tratamientos.

Se almacenó en oscuridad y temperatura ambiente (10-20°C) por seis meses. Durante ese período se evaluó la oxidación de lípidos (ésteres metílicos de ácidos grasos insaturados e índice de peróxidos), pigmentos clorofílicos y color.

2.3. Evaluación de la oxidación de lípidos

La evaluación de la oxidación de lípidos de las muestras de aceite comestible coloreado con oleorresina y de los dos controles se realizó a través de la cuantificación de ésteres metílicos de los ácidos grasos insaturados provenientes de triglicéridos y del índice de peróxidos.

La hidrólisis y metilación de los ácidos grasos insaturados se realizó según la metodología descrita por Araújo (1995). Se hidrolizó 50 μ L de muestra utilizando 1 mL de solución KOH/MeOH 0,5M a 100°C durante 5 min. en un tubo con tapa rosca. Luego se agregó 400 μ L de solución HCl:MeOH = 4:1 (v/v) y nuevamente se colocó a 100°C, durante 15 min. A continuación, se enfrió y agregó 2 mL de agua destilada y 3 mL de éter de petróleo. La mezcla fue agitada y se dejó reposar durante un minuto, obteniéndose la separación de fases. La fase superior fue retirada y la fase inferior fue lavada con 3 mL de éter de petróleo, se agitó y se dejó reposar por un minuto, recuperándose nuevamente la fase superior. El solvente del volumen total recuperado de la fase superior se evaporó por completo y el remanente fue luego disuelto en 750 μ L de acetona. De esta última solución se tomó 100 μ L y se le adicionaron 20 μ L del estándar interno. Luego se analizó utilizando un cromatógrafo Varian Star 3400 CX, con una columna capilar de 30 m de largo, 0,53 mm de diámetro interno y 0,5 μ m de fase estacionaria (DB-23), programada con gradiente de temperatura a 160°C, durante 2 minutos de tiempo inicial, con aumento de 3°C/min hasta 220°C, permaneciendo a esta temperatura por 20 minutos. Se operó con inyección "split" de 96/1 y se mantuvo la temperatura en el inyector y detector FID a 250°C. Para identificación y cuantificación se utilizó una mezcla estándar de ésteres metílicos de ácidos grasos palmítico, esteárico, oleico, linoleico y linoléico y el éster metílico del ácido heptadecanoico como estándar interno, todos de marca Alltech.

El índice de peróxidos se determinó según el método 965.33 de la AOAC (1990).

2.4. Análisis de pigmentos clorofílicos

Se analizaron los pigmentos clorofílicos de las muestras correspondientes a las cinco formulaciones de aceite comestible de girasol coloreado, con y sin adición de oleorresina de orégano (control).

La extracción de los pigmentos clorofílicos se realizó de acuerdo a lo descrito por Mínguez-Mosquera *et al.* (1992), con modificaciones. Se tomó 500 μ L de muestra en un tubo de ensayo, se agregó 1 mL de hexano y 1 mL de N,N-dimetilformamida (DMF), se agitó fuertemente por 30 s y se dejó reposar unos segundos hasta que se separaron las fases. Con pipeta Pasteur se eliminó la fase hexano. Se lavó la fase DMF tres veces con hexano para eliminar la ma-

yor cantidad de aceite. Se agregó 2 mL de éter etílico y agua destilada y nuevamente se agitó por 30 s. Se dejó reposar unos segundos hasta separación completa de las fases y se eliminó la DMF mezclada con agua. El éter se lavó 3 veces con agua destilada para asegurar la completa eliminación de DMF. Luego se recogió la fase etérea en tubo de ensayo limpio con ayuda de una pipeta Pasteur seca. Se dejó secar el éter y finalmente se disolvió la muestra en 200 μ L de acetona pura. Durante la extracción se trabajó en ausencia de luz para evitar el foto - blanqueo de los pigmentos. La identificación y cuantificación de los pigmentos clorofílicos se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución, inyectándose 20 μ L de la solución resultante de la extracción de pigmentos. Se utilizó una columna Lichrosphere 100 RP18 (5 μ m) marca Merck, una bomba HPLC La-Chrom (Merck - Hitachi, modelo L-7100) y un detector lineal UV - visible (Merck - Hitachi, modelo L-4250). Se realizó elución en gradiente (a una velocidad de 1 mL/min), empleando al inicio de la corrida 100% de A (80% metanol y 20% agua) y 0% de B (acetato de etilo) hasta llegar en 20 minutos a 50% A y 50% B; y luego se mantuvo en esta condición por otros 25 minutos. Se usó el detector a 420 nm, dado que a esa longitud de onda absorben todos los pigmentos clorofílicos (clorofila *a,b*, clorofilida *a,b*, feofitina *a,b* y feoforbido *a,b*). Los carotenoides que aparecían en los cromatogramas, porque absorben a esa longitud de onda, no pudieron identificarse por falta de los correspondientes estándares. Se emplearon estándares de clorofila *a* y clorofila *b* de marca Sigma y las clorofilidas *a,b* fueron obtenidas al hacer reaccionar la clorofila correspondiente con clorofilasa obtenida de acelga (*Beta-vulgaris* L cv. Cicla) (Schoch and Ihl, 1998). Las feofitinas *a,b* se prepararon adicionando una gota de HCl 2N a las respectivas clorofilas y deslavando la fase hexano hasta neutralidad. Los feoforbidos *a,b* se prepararon acidificando las clorofilidas extraídas en acetona; los feoforbidos formados se extrajeron con acetato de etilo, se deslavarón con agua hasta pH neutro, se secaron en corriente de N₂ y se disolvieron en acetona (Schoch and Brown, 1987; Shioi, 1991; Yamauchi and Watada, 1991).

Los pigmentos fueron inyectados disueltos en 80% de acetona en triplicado, para diferentes concentraciones, obteniendo el tiempo de retención y una relación área/pmol, con un margen de error de 5%. El tiempo de retención para cada pigmento fue: clorofilida *b* 2,8 \pm 0,5 min; clorofilida *a* 5,5 \pm 0,5 min; feoforbido *b* 9,7 \pm 0,3 min; feoforbido *a* 12,5 \pm 0,3 min; clorofila *b* 21,5 \pm 0,5 min; clorofila *a* 23,7 \pm 0,7 min; feofitina *b* 26,0 \pm 0,3 min y feofitina *a* 29,4 \pm 0,5 min (Figura 1).

2.5. Determinación de color

La determinación del color de las muestras de aceite comestible coloreado con oleorresina y de los

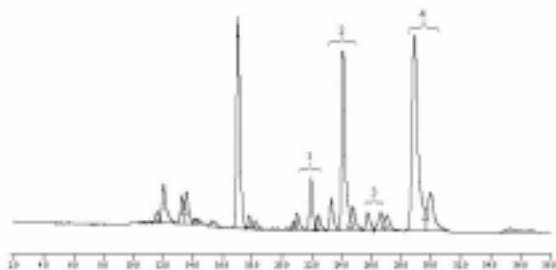


Figura 1
Cromatograma obtenido del análisis de pigmentos clorofilicos de una de cuatro repeticiones de la formulación de aceite coloreado control (A.C.) al inicio del almacenamiento, identificándose clorofilas *b* (1), clorofilas *a* (2), feofitinas *b* (3) y feofitinas *a* (4).

dos controles se realizó con un colorímetro Minolta utilizando el sistema CIE $L^* a^* b^*$.

Se tomó una alícuota de 30 mL de muestra y se depositó en un cilindro de cuarzo, colocándole un papel blanco en la superficie libre del aceite para evitar interferencia de la luz. Se disparó el haz de luz del colorímetro en el fondo del envase y se anotaron los valores de L^* , a^* , b^* .

2.6. Análisis estadístico

Los datos de concentración de ésteres metílicos de ácidos grasos insaturados, índice de peróxidos, pigmentos clorofilicos y color, obtenidos durante el almacenamiento en oscuridad, se trataron a través de análisis de varianza y prueba de Duncan, considerando un nivel de significancia de 5%.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Estabilidad de lípidos durante el almacenamiento

En las Tablas I y II se muestra, durante el período de almacenamiento en oscuridad, la evolución de la concentración de los dos principales ácidos grasos insaturados presentes en las muestras de los seis tratamientos, los que fueron analizados en la forma de ésteres metílicos provenientes de la hidrólisis de los triglicéridos, que forman parte del aceite comestible de girasol.

Se observa una disminución significativa ($p < 0,05$) en las concentraciones de los ácidos oleico y linoleico entre el inicio y final del sexto mes de almacenamiento. Mientras la concentración del ácido oleico al final del almacenamiento (6° mes) representa entre un 57,7% - 64,9% de la concentración inicial, para los distintos tratamientos, las concentraciones finales para el ácido linoleico representan entre un 24,1% - 31,1% de la concentración inicial. Esto significa que la reducción en la concentración de ácido linoleico fue mayor que la del ácido oleico. Por otro lado, el análisis de varianza determinó que no existieron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los tratamientos durante el período de almacenamiento, tanto para el parámetro concentración de ácido oleico como concentración de ácido linoleico. Por consiguiente, se puede entender que la transformación química, tanto del ácido oleico como linoleico esterificados al glicerol, se procesó de igual forma para las cinco formulaciones de aceite coloreado con y sin adición de oleorresina (A.C., 200, 400, 600 y 800 ppm) y el control de aceite puro (A.P.). Esta transformación se podría deber a la autooxidación lipídica con formación de peróxidos.

En la Tabla III se muestra la evolución del índice de peróxidos de los distintos tratamientos las muestras de aceite. La determinación de índice de peróxi-

Tabla I

Evolución de la concentración de ésteres metílicos de ácido oleico en el aceite comestible de girasol coloreado con pigmentos clorofilicos y adicionado de oleorresina de orégano (200, 400, 600 y 800 ppm) y en los controles (aceite puro A.P. y aceite coloreado sin oleorresina A.C.), durante el almacenamiento en oscuridad (mg/50 μ L de muestra)

| Tiempo (Meses) | Tratamientos* | | | | | |
|-------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|
| | A.P. | A.C. | 200 ppm | 400 ppm | 600 ppm | 800 ppm |
| 3 | 9,06±1,59 ^a | 9,28±0,48 ^a | 7,99±0,65 ^a | 8,98±0,74 ^a | 9,38±1,25 ^a | 8,49±1,62 ^a |
| 6 | 7,13±0,66 ^{ab} | 7,04±0,60 ^{ab} | 6,64±0,15 ^b | 6,88±0,56 ^{ab} | 7,46±0,50 ^a | 6,70±0,63 ^b |

*La concentración de ésteres metílicos de ácido oleico en el tiempo cero de almacenamiento fue 11,50±1,53 mg/50 μ L de muestra (promedio entre los datos de una repetición de cada tratamiento).

^{a,b}Promedios y desviación estándar de cuatro repeticiones por tratamiento. Los valores de una misma línea que presentan igual letra no difieren entre sí a $p < 0,05$ por la prueba de Duncan.

Tabla II
Evolución de la concentración de ésteres metílicos de ácido linoleico en el aceite comestible de girasol coloreado con pigmentos clorofilicos y adicionado de oleorresina de orégano (200, 400, 600 y 800 ppm) y en los controles (aceite puro A.P. y aceite coloreado sin oleorresina A.C.), durante el almacenamiento en oscuridad (mg/50 μ L de muestra)

| Tiempo (Meses) | Tratamientos* | | | | | |
|-------------------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| | A.P. | A.C. | 200 ppm | 400 ppm | 600 ppm | 800 ppm |
| 3 | 19,33 \pm 1,10 ^b | 18,29 \pm 0,42 ^{bc} | 18,56 \pm 1,10 ^{bc} | 18,14 \pm 1,31 ^c | 21,31 \pm 0,56 ^a | 19,09 \pm 1,04 ^{bc} |
| 6 | 7,07 \pm 0,79 ^a | 6,99 \pm 0,64 ^a | 5,45 \pm 0,35 ^c | 6,12 \pm 1,18 ^{bc} | 6,81 \pm 0,51 ^{ab} | 5,67 \pm 0,95 ^c |

*La concentración de ésteres metílicos de ácido linoleico en el tiempo cero de almacenamiento fue 22,5 \pm 3,74 mg/50 μ L de muestra (promedio entre los datos de una repetición de cada tratamiento).

^{a-c}Promedios y desviación estándar de cuatro repeticiones por tratamiento. Los valores de una misma línea que presentan igual letra no difieren entre sí a $p < 0,05$ por la prueba de Duncan.

Tabla III
Evolución del índice de peróxidos en el aceite comestible de girasol coloreado con pigmentos clorofilicos y adicionado de oleorresina de orégano (200, 400, 600 y 800 ppm) y en los controles (aceite puro A.P. y aceite coloreado sin oleorresina A.C.), durante el almacenamiento en oscuridad (meq/kg de muestra)

| Tiempo (Meses) | Tratamientos* | | | | | |
|-------------------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | A.P. | A.C. | 200 ppm | 400 ppm | 600 ppm | 800 ppm |
| 1 | 3,86 \pm 0,26 ^b | 5,40 \pm 0,39 ^a | 5,17 \pm 0,27 ^a | 3,83 \pm 0,62 ^b | 3,94 \pm 0,01 ^b | 4,07 \pm 0,26 ^b |
| 2 | 6,51 \pm 0,48 ^a | 6,86 \pm 0,02 ^a | 5,40 \pm 0,57 ^a | 5,66 \pm 1,50 ^a | 4,17 \pm 0,48 ^a | 4,90 \pm 1,32 ^a |
| 3 | 14,61 \pm 2,04 ^a | 12,31 \pm 0,85 ^{ab} | 11,19 \pm 0,44 ^{ab} | 9,56 \pm 3,84 ^b | 9,32 \pm 0,68 ^b | 9,33 \pm 2,92 ^b |

*El índice de peróxidos en el tiempo cero de almacenamiento fue 1,98 \pm 0,02 meq/kg de muestra (promedio entre los datos de una repetición de cada tratamiento).

^{a,b}Promedios y desviación estándar de cuatro repeticiones por tratamiento. Los valores de una misma línea que presentan igual letra no difieren entre sí a $p < 0,05$ por la prueba de Duncan.

dos se realizó sólo hasta el tercer mes de almacenamiento debido a que en ese momento se alcanzaron valores correspondientes al límite máximo establecido en la normativa chilena para grasa y aceites comestibles y que es de 10 meq/kg (Ministerio de Salud, 1997).

Se observó un aumento significativo ($p < 0,05$) en los valores de índice de peróxido entre el inicio y fin del tercer mes de almacenamiento, pero no se encontraron diferencias entre los tratamientos ($p > 0,05$) para ese período de tiempo.

Para poder evaluar el efecto de la adición de pigmentos clorofilicos y de la oleorresina de orégano en la estabilidad del aceite comestible de girasol, se consideraron los resultados de los dos ácidos grasos estudiados e índice de peróxidos, obtenidos al final del tercer mes de almacenamiento. No existieron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los tratamientos para la concentración de ácido oleico, pero si

($p < 0,05$) para la de ácido linoleico, siendo la concentración de formulación de 600 ppm significativamente mayor que en los demás tratamientos (Tablas I y II). Los valores de índice de peróxidos al final del tercer mes de almacenamiento (Tabla III), muestran que los tratamientos A.P y A.C. no difirieron estadísticamente y tampoco las formulaciones de aceite coloreado control, 200, 400, 600 y 800 ppm de oleorresina.

Por lo tanto, al realizar la comparación al final del tercer mes de almacenamiento entre concentración de ácidos grasos insaturados e índice de peróxidos, se observa que existe una relación inversa entre los dos parámetros estudiados. En las Tablas I, II y III se constata que a mayores concentraciones de los dos ésteres metílicos de ácidos grasos, menor es el valor de índice de peróxidos. Esto concuerda con el proceso de autoxidación lipídica de los aceites y grasas en que los ácidos grasos insaturados, que forman

parte de los triglicéridos, son transformados en peróxidos (Araujo, 1995).

Al final del sexto mes de almacenamiento se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos, tanto en las concentraciones de ácido oleico como de ácido linoleico (Tablas I y II). Al comparar los tratamientos A.P. y A.C., se observa que no difirieron significativamente ($p > 0,05$) en ácido oleico y linoleico, por lo tanto se podría considerar que ambos tratamientos presentaron similar estabilidad al finalizar el sexto mes de almacenamiento. Cuando se compara el tratamiento A.C. con los tratamientos 200, 400, 600 y 800 ppm no se evidencia la acción antioxidante de la oleorresina de orégano adicionada al aceite coloreado. De hecho, la concentración del ácido oleico en el tratamiento A.C. no difirió ($p > 0,05$) de la concentración de las cuatro formulaciones en que se adicionó oleorresina, y para el ácido linoleico, la concentración de éste en el tratamiento A.C. fue mayor que la presentada por todas las otras formulaciones coloreadas y con oleorresina.

Considerando que no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos A.P. y A.C., para concentración de ésteres metílicos de ácidos grasos e índice de peróxidos, se puede indicar que el aceite comestible de girasol coloreado con pigmentos clorofílicos muestra una estabilidad equivalente al aceite puro, cuando es almacenado en oscuridad por tres o seis meses.

Al comparar las cuatro formulaciones de aceite comestible de girasol, coloreado y con adición de oleorresina en distintas concentraciones, con el tratamiento A.C., en general no se pudo observar al final del tercer y sexto mes un claro efecto de la acción antioxidante que tendría la oleorresina de orégano adicionada.

En general, los tratamientos en que se adicionó al aceite coloreado oleorresina (200, 400, 600 y 800 ppm) fueron todos equivalentes tanto al final del tercer como del sexto mes de almacenamiento.

3.2. Color

En la Tabla IV se muestra la evolución en la diferencia de color (ΔE), durante el período de almacenamiento en oscuridad, para las muestras de aceite comestible de girasol, coloreado con pigmentos clorofílicos, adicionado de oleorresina de orégano y para los dos controles.

Los resultados de diferencias de color [$\Delta E = (\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2$] del sistema CIEL *a*b* presentados en la Tabla IV muestran la variación en el color de las muestras entre el inicio del almacenamiento y el final de cada uno de los tres primeros meses de almacenamiento.

Los ΔE determinados durante el almacenamiento no difirieron significativamente ($p > 0,05$) entre sí. Por tanto, se puede entender que para todos los tratamientos ocurrió una variación en el color de las muestras en el primer mes y este parámetro se mantuvo estable en los dos meses siguientes. Sin embargo, para el tratamiento A.P., la variación en el color ocurrió durante el segundo mes, dado que el valor de ΔE fue cero entre el inicio y final del primer mes.

Al final del tercer mes se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los ΔE de las distintas formulaciones. Esto significa que la intensidad con que varió el color entre el inicio y el final del tercer mes fue diferente entre los tratamientos, siendo el color de las muestras de aceite comestible de girasol puro el que mayor variación experimentó en ese período de tiempo.

La variación en el color que se observó durante el almacenamiento, para las cinco formulaciones en que se adicionaron pigmentos clorofílicos, se debió principalmente a la transformación de clorofilas en feofitinas, y que como se ve en la Tabla V, provocó una disminución en el porcentaje de clorofilas y un aumento en el de feofitinas entre el inicio del almace-

Tabla IV

Evolución en la diferencia de color (ΔE) para el aceite comestible de girasol coloreado con pigmentos clorofílicos y adicionado de oleorresina de orégano (200, 400, 600 y 800 ppm) y para los dos controles (aceite puro A.P. y aceite coloreado sin oleorresina A.C.), durante el almacenamiento en oscuridad

| Tiempo (meses) | Tratamientos | | | | | |
|-------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | A.P. | A.C. | 200 ppm | 400 ppm | 600 ppm | 800 ppm |
| 1 | 0,00±0,00 ^e | 0,86±0,29 ^d | 1,32±0,29 ^{bc} | 0,97±0,47 ^{cd} | 1,40±0,15 ^b | 2,01±0,08 ^a |
| 2 | 1,64±0,54 ^a | 1,11±0,16 ^a | 1,57±0,38 ^a | 1,40±0,30 ^a | 1,65±0,34 ^a | 1,53±0,19 ^a |
| 3 | 1,75±0,39 ^a | 1,31±0,25 ^b | 1,15±0,40 ^{bc} | 0,78±0,13 ^c | 0,98±0,14 ^{bc} | 1,37±0,21 ^{ab} |

^{a-e}Promedios y desviación estándar de cuatro repeticiones por tratamiento. Los valores de una misma línea que presentan igual letra no difieren entre sí a $p < 0,05$ por la prueba de Duncan.

Tabla V

Evolución de la clorofila *a*, clorofila *b*, feofitina *a* y feofitina *b* con relación al total de pigmentos clorofílicos presente en el aceite comestible de girasol coloreado y adicionado de oleorresina de orégano (200, 400, 600 y 800 ppm) y en el control de aceite coloreado sin oleorresina (A.C.), durante el almacenamiento en oscuridad (Promedios de cuatro repeticiones por tratamiento)

| Tiempo (Meses) | Tratamiento | | | | | | | | | |
|----------------|-------------|-------|---------|-------|---------|-------|---------|-------|---------|-------|
| | A.C. | | 200 ppm | | 400 ppm | | 600 ppm | | 800 ppm | |
| 0 | 21,00 | 22,20 | 22,20 | 23,60 | 12,20 | 20,00 | 15,10 | 21,50 | 19,00 | 20,80 |
| | 41,70 | 11,40 | 37,50 | 13,30 | 41,69 | 13,70 | 40,90 | 13,50 | 39,90 | 17,90 |
| 1 | 7,64 | 17,40 | 10,60 | 19,70 | 7,08 | 15,00 | 7,08 | 17,70 | 12,40 | 18,00 |
| | 56,40 | 15,90 | 49,30 | 16,50 | 49,30 | 14,97 | 49,80 | 16,60 | 46,40 | 19,50 |
| 2 | 8,83 | 18,10 | 9,22 | 20,00 | 7,00 | 19,40 | 7,41 | 22,40 | 11,00 | 14,00 |
| | 52,60 | 17,10 | 48,10 | 18,60 | 44,85 | 17,10 | 44,80 | 18,50 | 50,60 | 22,40 |
| 3 | 5,58 | 21,00 | 8,91 | 21,20 | 7,77 | 15,80 | 7,05 | 16,50 | 12,40 | 22,07 |
| | 53,60 | 14,50 | 45,70 | 18,70 | 47,90 | 19,00 | 48,50 | 21,40 | 38,60 | 23,90 |

Clorofila *a* (%) Clorofila *b* (%) Feofitina *a* (%) Feofitina *b* (%)

namiento y el final del primer mes, porcentajes que se mantuvieron estables en los dos meses siguientes.

Como también se determinó variación en el color de las muestras de aceite comestible de girasol puro, se puede considerar que la variación en el color de las muestras coloreadas (A.C., 200, 400, 600 y 800 ppm) no se debió exclusivamente a la adición de los pigmentos clorofílicos al aceite.

3.3. Pigmentos clorofílicos

En la Tabla V se muestra que durante el almacenamiento, el porcentaje de clorofila *a* disminuyó para todos los tratamientos. Para el primer mes tal disminución fue significativa ($p < 0,05$), representa un 36% de la clorofila *a* presente en el aceite al inicio del almacenamiento, y se mantuvo constante durante el resto del almacenamiento. Entre muestras con distintas concentraciones de oleorresina hubo diferencia significativa en el porcentaje de clorofila *a*. En la feofitina *a* se observa durante el primer mes del almacenamiento un aumento significativo, coincidente con la baja observada en la clorofila *a*, para luego mantenerse durante el resto del almacenamiento. El porcentaje de feofitina *a* entre tratamientos no presentó diferencia significativa. En el aceite pigmentado control (A.C.) se observa que en el primer mes de almacenamiento la clorofila *a* bajó en 13,4 puntos porcentuales y la feofitina *a* aumentó en 14,7 puntos. El porcentaje alto de feofitinas al inicio del almacenamiento puede deberse a los ácidos liberados durante

la desintegración celular ocurrida al homogenizar las hojas verdes para extraer los pigmentos (Mínguez-Mosquera, 1997).

En relación a la clorofila *b* (Tabla V), ésta no presenta cambios significativos durante el almacenamiento, tampoco existe diferencia entre los diferentes tratamientos. Esto era de esperar, dado que la clorofila *b* es más estable como pigmento (Rüdiger and Schoch, 1989) que la clorofila *a*, además de peor sustrato para la clorofilasa (Schoch & Ihl, 1998). Al observar el aceite pigmentado control (A.C.), en el primer mes de almacenamiento, se aprecia un aumento de 4,5 puntos porcentuales en la feofitina *b* y una degradación de 4,8 puntos porcentuales de la clorofila *b*.

El hecho de que la clorofila se haya degradado a feofitina no afectó el efecto prooxidante que ésta presenta, ya que sólo en tres meses, en la muestra pigmentada control (A.C.), la concentración de peróxidos al final del almacenamiento (tercer mes), aumentó a más del doble de lo obtenido en el primer mes. Este resultado concuerda con lo informado por Schwartz & Lorenzo (1990), que dicen que las feofitinas en aceite comestible presentan una mayor capacidad prooxidante en relación a las clorofilas.

En las cinco formulaciones en que se adicionaron pigmentos clorofílicos al aceite comestible de girasol, los porcentaje de clorofila *a,b* más feofitina *a,b* con relación al total de pigmentos clorofílicos permanecieron constantes durante los tres primeros meses de almacenamiento y no se evidenciaron diferencias estadísticas (Tabla VI).

Tabla VI
Evolución de la suma de clorofila *a,b* con feofitina *a,b* con relación al total de pigmentos clorofílicos presente en el aceite comestible de girasol coloreado y adicionado de oleorresina de orégano (200, 400, 600 y 800 ppm) y en el control de aceite coloreado sin oleorresina (A.C.), durante el almacenamiento en oscuridad (%)

| Tiempo (Meses) | Tratamientos | | | | |
|-------------------|--------------|------------|-------------|-------------|------------|
| | A.C. | 200 ppm | 400 ppm | 600 ppm | 800 ppm |
| 0 | 96,73±2,44 | 96,50±3,26 | 87,66±15,96 | 91,11±13,02 | 97,53±1,89 |
| 1 | 97,35±1,41 | 96,19±2,52 | 86,30±12,03 | 91,10±8,19 | 96,53±1,20 |
| 2 | 96,55±2,05 | 95,98±2,29 | 88,29±7,69 | 93,15±8,29 | 97,97±1,91 |
| 3 | 94,66±1,05 | 94,03±0,96 | 90,40±7,98 | 93,46±3,40 | 97,60±1,38 |

Promedios y desviación estándar de cuatro repeticiones por tratamiento.

Al inicio del almacenamiento del aceite coloreado, se determinó una concentración promedio del total de pigmentos clorofílicos, para los cinco tratamientos de 110 $\mu\text{moles/L}$ ($\sigma = 21,6 \mu\text{moles/L}$), al final del primer mes de 136 $\mu\text{moles/L}$ ($\sigma = 43,6 \mu\text{moles/L}$), al final del segundo y tercer mes de 122 $\mu\text{moles/L}$ de aceite coloreado, con desviaciones estándares de 23,7 y 18,5 $\mu\text{moles/L}$, respectivamente. Esto muestra que el total de los pigmentos clorofílicos adicionados a las muestras de aceite comestible de girasol se mantuvo estable durante los tres primeros meses (ver Tabla VI), ocurriendo la mayor transformación de clorofilas en feofitinas (Tabla V) en el primer mes de almacenamiento, lo que concuerda con estudios anteriores realizados en aceites de girasol, soja, pepa de uva, maíz y oliva (González, 1997).

Se puede concluir que el aceite comestible de girasol coloreado muestra una estabilidad equivalente al aceite puro, cuando es almacenado en oscuridad por tres o seis meses, dado que no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los tratamientos A.P. y A.C., para ésteres metílicos de ácidos oleico y linoleico e índice de peróxidos. En general, los tratamientos en que se adicionó al aceite coloreado oleorresina de orégano (200, 400, 600 y 800 ppm) fueron todos equivalentes y no se observó un claro efecto de la acción antioxidante que tendría la oleorresina de orégano adicionada al aceite coloreado.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el financiamiento de la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica CONICYT, a través del Proyecto FONDECYT 1980392.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdalla, A. E. and Roozen, J. P. (1999). Effect of plant extracts on the oxidative stability of sunflower oil and emulsion. *Food Chemistry*, **64**, 323-329.
- AOAC (1990). Official Methods of Analysis, 15th Ed., Vol. 2, Association of Official Analytical Chemists, Arlington.
- Araujo, J. (1995). Química de Alimentos: Teoría e Práctica, Imprensa Universitária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- Chang, S., Ostric-Matijasevic, B., Hsieh, O. and Huang, C. (1977). Natural antioxidants from rosemary and sage. *Journal of Food Science*, **42**, 1102-1106.
- Cuvelier, M., Berset, C. and Richard, H. (1994). Antioxidant constituents in sage (*Salvia officinalis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **42**, 665-669.
- Endo, Y., Usuki, R. and Kaneda, T. (1985 a). Antioxidant effects of chlorophyll and pheophytin on autoxidation of oils in the dark. I. Comparison of the inhibitory effects. *Journal of American Oil Chemists Society*, **62**, 1375-1378.
- Endo, Y., Usuki, R. and Kaneda, T. (1985 b). Antioxidant effects of chlorophyll and pheophytin on autoxidation of oils in the dark. II. The mechanism of antioxidative action of chlorophyll. *Journal of American Oil Chemists Society*, **62**, 1387-1390.
- Frankel, E., Huang, S., Aeschbach, R. and Prior, E. (1996). Antioxidant activity of a rosemary extract and its constituent, carnosic acid, carnosol, and rosmarinic acid, in bulk oil and oil-in-water emulsion. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, **44**, 131-135.
- French, C.S. (1969). The Chlorophylls in Vivo and in Vitro en *Encyclopedia of Plant Physiology* Vol. 1, p. 252-297, W. Ruhland (Ed.), Springer, Berlin.
- Gandul-Rojas, B., Cepero, M.R., Mínguez-Mosquera, M.I. (1999). Chlorophyll and carotenoid patterns in olive fruits, *Olea europaea* Cv. Arbequina. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **47**, 2207-2212.
- Giese, J. (1994). Spice and seasoning blends: a taste for all seasons. *Food Technology*, **48**, 88-98.
- González, P. (1997). Estudio de pigmentos clorofílicos en Grasas y Aceites. Trabajo para optar al título de ingeniero en alimentos, Universidad de La Frontera, Temuco.

- Hendry, G.A.F. (1996). Chlorophylls and Chlorophyll Derivatives en *Natural Food Colorants*, p. 131-156, G.A.F. Hendry and J.D. Houghton (Eds.), Blackie Academic and Professional, Glasgow.
- Henry, B. (1996). Natural Food Colours en *Natural Food Colorants*, p. 40-79, G.A.F. Hendry and J.D. Houghton (Eds.), Blackie Academic and Professional, Glasgow.
- Ihl, M., Monsalves, M. and Bifani, V. (1998). Chlorophyllase inactivation as a measure of blanching efficacy and colour retention of artichokes (*Cynara scolymus* L.). *Food Science & Technology/LWT* **31**, 50-56.
- Inatani, R., Nakatani, N. and Fuwa, H. (1983). Antioxidative effect of the constituents of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and their derivatives. *Agricultural and Biological Chemistry*, **47**, 521-528.
- Lindberg, M. and Bertelsen, G. (1995). Spices as antioxidant. *Trends in Food Science & Technology*, **6**, 271-277.
- Ministerio de Salud (1997). Reglamento Sanitario de los Alimentos, Decreto Supremo N° 977, Santiago de Chile.
- Mínguez-Mosquera, M., Grandul-Rojas, B. and Gallardo-Guerrero, M. (1992). Rapid method of quantification of chlorophylls and carotenoids in virgin olive oil by high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, **40**, 60-63.
- Mínguez-Mosquera, M.I. (1997). Clorofilas y Carotenoides en Tecnología de Alimentos. Universidad de Sevilla, Serie Ciencias 47.
- Rüdiger, W. and Schoch, S. (1989). Abbau von chlorophyll. *Naturwissenschaften* **76**, 453-457.
- Schmidt-Hebbel, H. (1980). Las Especies (condimentos vegetales), su Importancia en Química y Tecnología de Alimentos y en el Arte Culinario. Fundación Chile, Santiago de Chile.
- Schoch, S. and Brown, J. (1987). The action of chlorophyllase on chlorophyll-protein complexes. *Journal of Plant Physiology*, **126**, 483-494.
- Schoch, S. and Ihl, M. (1998). Substrate specificity of chlorophyllase from different plants. *Zeitschrift für Naturforschung*, **53c**, 21-26.
- Shioi, Y. (1991). Analytical Chromatography of Chlorophylls en Chlorophylls, H. Scheer, (Ed.), CRC Press, Boca Raton.
- Schwartz, S. J. and Lorenzo, T. V. (1990). Chlorophylls in foods. *Food Science and Nutrition* **29**, 1-17.
- Wellburn, A. R. (1994). The spectral determination of chlorophylls a and b , as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*, **144**, 307-313.
- Yamauchi, N. and Watada, A. (1991). Regulated chlorophyll degradation in spinach leaves during storage. *Journal of American Society of Horticultural Science*, **116**, 58-62.

Recibido: Marzo 2001
Aceptado: Marzo 2002